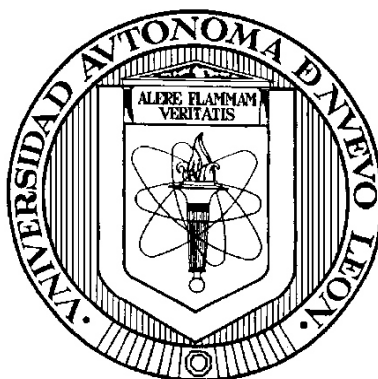


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“EFECTIVIDAD TERAPÉUTICA DE AMIKACINA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS O ADQUIRIDAS,
EVALUADA POR PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS”**

POR

Q.F.B. CLAUDIA VALERIA CRUZ SAUCEDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACIA**

DICIEMBRE, 2018

**“Efectividad terapéutica de Amikacina en pacientes pediátricos con
cardiopatías congénitas o adquiridas, evaluada por parámetros
Farmacocinéticos”**

Aprobación de la Tesis

Dra. Élida Marcela Aguilar Bravo
Presidente

Dr (a).
Secretaria

Dr (a).
Vocal

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Diciembre, 2018

“Efectividad terapéutica de Amikacina en pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas o adquiridas, evaluada por parámetros Farmacocinéticos”

Revisión de la Tesis

Dra. Élida Marcela Aguilar Bravo
Directora de Tesis

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán
Co-Directora de Tesis

Dr. Adolfo Caballero Quintero
Co-Director de Tesis (Externo)

Dr. Arturo Muñiz García
Co-Director de Tesis (Externo)

Dra. Ivonne Antonieta Camacho Mora
Comité de Tesis

Dr. Omar González Santiago
Comité de Tesis

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Comité de Tesis

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Diciembre, 2018

RESUMEN

Claudia Valeria Cruz Saucedo

Fecha de Graduación: Diciembre, 2018

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Autónoma de Nuevo León

TÍTULO DEL ESTUDIO: Efectividad terapéutica de Amikacina en pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas o adquiridas, evaluada por parámetros Farmacocinéticos.

Número de páginas: 113

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método de Estudio: Evaluar la efectividad terapéutica de Amikacina en pacientes pertenecientes a la Unidad de Cuidados Intensivos Post-quirúrgicos de Pediatría, de la UMAE No. 34 del IMSS, mediante la relación C_{max}/CMI , así como parámetros Farmacocinéticos, donde la C_{max} se cuantifica en plasma humano con un método analítico por HPLC-MS/MS, que se desarrolló y validó en el laboratorio de Química Forense de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Nuevo León.

Contribuciones y Conclusiones: Evaluar la efectividad terapéutica de Amikacina para establecer lineamientos para su uso racional, evitar la aparición de efectos adversos y la resistencia bacteriana.

FIRMA DEL ASESOR

Dra. Érida Marcela Aguilar Bravo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Forense del Instituto de Criminalística y Servicios Periciales de la Fiscalía General de Justicia de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Adolfo Caballero Quintero; en la Unidad de Cuidados Intensivos Post-Quirúrgicos de Pediatría de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Cardiología No. 34 del IMSS a través del Dr. Arturo Muñoz García.

AGRADECIMIENTOS

A mi hijo Rubén Adrián Castilleja Cruz, por todo su amor y apoyo.

DEDICATORIAS

A mi familia y a mi hijo.

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Farmacocinética clínica.....	1
1.1.1. Funciones de la farmacocinética clínica.....	1
1.2. Farmacología pediátrica.....	2
1.3. Monitoreo Terapéutico de Fármaco(MTF).....	2
1.3.1. Justificación del monitoreo terapéutico.....	3
1.3.2. Monitoreo de antibióticos.....	4
1.3.3. Técnicas para el monitoreo de fármacos.....	4
1.3.3.1. Ensayo de polarización de fluorescencia (FPIA).....	4
1.3.3.2. Inmunoanálisis enzimático homogéneo.....	5
1.3.3.3. Ensayo homogéneo de inmunoinhibición.....	5
1.3.3.4. Técnicas cromatográficas.....	6
1.3.3.4.1. Cromatografía de gases.....	6
1.3.3.4.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución...6	6
1.3.3.4.3. Espectrometría de masas (MS).....	6
1.3.3.4.4. HPLC-MS/MS	7
1.4. Antibióticos.....	9
1.4.1. Farmacocinética y farmacodinamia antibióticos.....	10
1.4.2. Aminoglucósidos.....	10
1.4.2.1. Actividad antimicrobiana.....	11
1.4.2.2. Indicaciones terapéuticas.....	11
1.4.2.3. Mecanismo de acción.....	12
1.4.2.4. Modo de administración.....	13
1.4.2.5. Régimen de administración.....	13
1.4.2.6. Consideraciones en pacientes pediátricos.....	14
1.4.2.7. Efectividad terapéutica.....	16
1.4.2.8. Objetivo PK/PD en la terapia con Aminoglucósidos.....	16
1.4.2.8.1. Concentración Mínima Inhibitoria.....	16
1.4.2.8.2. Marcador de efectividad terapéutica.....	16
1.4.2.9. Efecto post antibiótico.....	17
1.4.2.10. Seguridad de la terapia con Aminoglucósidos.....	17
1.4.2.10.1. Toxicidad renal.....	17
1.4.2.10.2. Ototoxicidad.....	19
1.4.2.11. Resistencia antimicrobiana.....	20
1.4.2.11.1. Mecanismos de resistencia Aminoglucósidos	
1.4.2.12. Resistencia adaptativa.....	22
1.4.3. Amikacina.....	23
1.4.3.1. Farmacología.....	24

1.4.3.1.1. Parámetros farmacocinéticos.....	24
1.4.3.1.2. Dosificación y monitoreo clínico.....	25
1.4.3.1.3. Ajuste de dosis.....	26
1.4.3.1.4. Indicaciones terapéuticas de Amikacina.....	27
1.4.3.1.5. Consideraciones en poblaciones pediátricas.....	27
1.4.3.1.6. Resistencia a Amikacina.....	28
2. ANTECEDENTES.....	29
3. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
3.1. Justificación.....	38
3.2. Hipótesis.....	39
3.3. Objetivo general.....	40
3.4. Objetivos específicos.....	40
4. Metodología.....	41
4.1. Estrategia general.....	41
4.2. Materiales y métodos.....	41
4.2.1. Equipo.....	41
4.2.1.1 Instrumentos y herramientas.....	41
4.2.2. Reactivos.....	43
4.2.3. Materiales.....	43
4.2.4. Métodos Etapa I.....	44
4.2.4.1 Preparación de soluciones estándar, soluciones de trabajo, reactivos y controles.....	45
4.2.4.2 Optimización manual de Amikacina en el EM-MS.....	48
4.2.4.3 Optimización manual de Kanamicina B en el EM-MS.....	48
4.2.4.4 Optimización de los parámetros de la fuente de iones.....	50
4.2.4.5 Condiciones Cromatográficas.....	51
4.2.4.6 Preparación de la curva de calibración.....	51
4.2.4.7 Desarrollo del método analítico.....	56
4.2.4.7 Validación del método analítico.....	58
4.2.5 Métodos Etapa II.....	62
4.2.5.1 Diseño del estudio.....	62
4.2.5.2 Lugar de estudio.....	62
4.2.5.3 Población de estudio.....	62
4.2.5.4 Criterios de selección de la muestra.....	62
4.2.5.5 Tamaño de la muestra.....	63
4.2.5.6 Definición de variables.....	63
4.2.5.7 Descripción general del estudio.....	63
4.2.5.8 Análisis Estadístico.....	64
4.2.5.9 Aspectos Éticos.....	64
4.2.5.10 Bioseguridad.....	66
4.2.6 Métodos Etapa III.....	67
4.2.6.1 Determinación de concentración de Amikacina....	67
4.2.6.2 Recolección de datos Microbiológicos.....	68
4.2.6.3 Evaluación de resultados.....	68
4.2.6.4 Análisis estadístico.....	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	91

4.2.6.4 Análisis estadístico.....	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	90
REFERENCIAS.....	91
ANEXO A.....	102
ANEXO B.....	108
ANEXO C.....	109
ANEXO D.....	111
ANEXO E.....	112
Resumen Autobiográfico.....	117

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Índice farmacodinámico correlacionado con máxima eficacia de algunos antimicrobianos.....	10
2. Factores de riesgo para el desarrollo de toxicidad renal.....	20
3. Enzimas modificadoras de Aminoglucósidos.....	21
4. Propiedades físicas y químicas de Amikacina.....	24
5. Parámetros farmacocinéticos de Amikacina en adultos con función renal normal.....	24
6. Obtención de muestras a intervalos terapéuticos recomendados.	25
7. Dosificación de Amikacina recomendada para neonatos.....	26
8. Sustancias de referencia.....	43
9. Diluciones seriadas a partir de una solución stock de Amikacina de 1 mg/mL.....	45
10. Diluciones seriadas a partir de una solución stock de Kanamicina B de 200 ug/mL.....	46
11. Preparación de soluciones de trabajo a partir de la solución de Amikacina 2 mg/mL.....	46
12. Preparación de soluciones de trabajo estándar interno a partir de la solución stock de Kanamicina B 200 ug/mL.....	47
14. Preparación de curva de calibración en matriz.....	47
15. Preparación de curva de calibración en matriz 2.....	48
16. Mezclas probadas para la optimización manual de Amikacina en el Espectrómetro de Masas.....	49
17. Mezclas probadas para la disolución de Kanamicina B.....	50
18. Condiciones Cromatográficas probadas durante el desarrollo del Método.....	51
19. Sistemas probados para la elección del solvente de elución.....	54
20. Sistemas probados para la elección de la composición de las	

soluciones de lavado.....	55
21. Condiciones Cromatográficas para la determinación de AMK/KAN B.....	56
22. Condiciones Espectrométricas para el análisis de AMK/KAN B...	57
23. Clasificación de la población de estudio.....	62
25. Condiciones Espectrométricas para el análisis de Amikacina.....	70
26. Mejores condiciones Cromatográficas obtenidas.....	73
27. Selectividad: Matriz enriquecida a 2 ug/mL de Amikacina.....	79
28. Interferencias: Matriz enriquecida a 2 ug/mL de Amikacina.....	80
29. Efecto Matriz: Matriz enriquecida a 2 ug/mL de Amikacina.....	81
30. Límite de cuantificación.....	81
31. Límite de detección.....	82
32. Acarreo.....	83
33. Linealidad.....	83
34. Repetibilidad.....	85
35. Reproducibilidad.....	85
36. Exactitud.....	86
37. Estabilidad tiempo cero.....	86
38. Estabilidad en automuestreador.....	86
39. Estabilidad en congelación.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Efecto post-antibiótico.....	17
2. Acumulación de gentamicina en lisosomas de túbulo proximal....	19
3. Mecanismos de resistencia de Aminoglucósidos.....	21
4. Representación de diferentes tipos de enzimas modificadora de antibióticos y su nomenclatura.....	22
5. Síntesis de Amikacina a partir de la Kanamicina A.....	23
6. ESI MS/MS para Amikacina.....	71
7. ESI MS/MS para Kanamicina B.....	72
8. Curva de calibración para una serie de soluciones estándar y puntos control.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

γ	Gamma
\geq	Mayor o igual que
$>$	Mayor que
\bar{X}	Media
\leq	Menor o igual que
$<$	Menor que
N	Número de mediciones realizadas
%	Porcentaje
Σ	Sumatoria
X_i	Valor de la medición individual
α	Alfa
Å	Angstrom
AAC-I	Aminoglucósido acetiltransferasa 1
AAC-1b	Aminoglucósido acetiltransferasa 1b
ABW	Peso corporal ajustado
ACN	Acetonitrilo
AMK	Amikacina
ANT	Aminoglucósido nucleotidiltransferasa
APH	Aminoglucósido fosfotransferasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
AUC	Área bajo la curva
°C	Grados centígrados
CC1	Punto 1 de la curva de calibración
C_1, C_2	Concentración
$C_{máx}$	Concentración máxima
Cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CrC	Aclaramiento de creatinina
CUR	Gas cortina
CV	Coeficiente de variación
CXP	Potencial de colisión de salida
DE	Desviación estándar
DP	Potencial de disgregación
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Estándar interno
EP	Potencial de entrada
ESI	Ionización por electrospray
FMA	Fase móvil "A"
FMB	Fase móvil "B"
FMN	Factor matriz normalizado
FPIA	Ensayo de polarización de fluorescencia
GS1	Gas nebulizante

GS2	Gas auxiliar
H	Horas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IBW	Peso corporal ideal
IM	Intramuscular
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IS	Voltaje de pulverización de iones
KAN B	Kanamicina B
kg	Kilogramo
L	Litros
LC	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
MB	Matriz blanco
MC	Matriz cero
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mg	Miligramos
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MRM	Monitoreo de Reacción Múltiple
MS-MS	Masas-Masas
MTS	Monitoreo Terapéutico de Fármacos
NOM	Norma Oficial Mexicana
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Punto control
PCO₂	Presión de dióxido de carbono
PD	Farmacodinamia
pH	Potencial de hidrógeno
PK	Farmacocinética
PO₂	Presión de oxígeno
RAM	Respuesta del analito en la matriz
RAS	Respuesta del analito en solución
REIM	Respuesta del estándar interno en la matriz
REIS	Respuesta del estándar interno en la solución
RN	Recién Nacido
ST	Solución de trabajo
TBW	Peso Corporal Total
TEM	Temperatura de la fuente de gas
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
V	Volts
V₁, V₂	Volumen

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Farmacocinética clínica

Es la disciplina científica que involucra todos los aspectos de la relación entre los fármacos y los humanos. Tiene como objetivo principal mejorar la atención del paciente, directa o indirectamente, desarrollando mejores medicamentos y promoviendo su uso más seguro y efectivo.

La farmacia clínica se apoya de estudios farmacoepidemiológicos, toxicológicos, monitoreo de fármacos y farmacovigilancia, teniendo como enfoque la medicina personalizada¹.

1.1.1 Funciones de la Farmacocinética clínica

La farmacocinética clínica evalúa la respuesta y los efectos adversos de los medicamentos, su uso y la economía de la terapia farmacológica. En materia de investigación de fármacos, colecciona métodos descriptivos y analíticos, teorías

para la cuantificación, comprensión y evaluación de los procesos de prescripción, dispensación y consumo de medicamentos, además prueba intervenciones para mejorar la calidad de estos procesos².

1.2 Farmacología Pediátrica

Estudia los fármacos que son utilizados en esta población, donde existen diferencias importantes en la Farmacocinética y la Farmacodinamia. Involucra el conocimiento del comportamiento de los medicamentos en un organismo en constante desarrollo y maduración para lograr una terapéutica efectiva, segura y racional. Abarca aspectos relacionados con su acción, forma de administración, indicaciones terapéuticas y acciones tóxicas, apoyándose de herramientas como el Monitoreo Terapéutico de Fármacos y Farmacovigilancia³.

1.3 Monitoreo Terapéutico de Fármacos (MTF)

Según la *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*, el MTF es una especialidad clínica multidisciplinaria destinada a mejorar la atención al paciente mediante el ajuste individual de dosis de aquellos medicamentos en los que se ha demostrado evidencia o experiencia de mejorar el resultado clínico en poblaciones generales o especiales⁴. Tiene como objetivo optimizar los tratamientos farmacológicos e individualizar la terapia, maximizando la eficacia terapéutica y minimizando la

ocurrencia de reacciones adversas. El uso de MTF, es una herramienta útil para reducir la variabilidad en determinadas situaciones clínicas⁵.

1.3.1 Justificación del Monitoreo Terapéutico

Se basa en la premisa de que hay una relación entre la concentración del fármaco en sangre y la existente a nivel de receptores. Cuando sea posible contar con un parámetro de seguimiento para el fármaco, no es necesario monitorizar con niveles plasmáticos. Los principales criterios para que un fármaco sea monitorizado son:

- I. Buena correlación entre el efecto farmacológico o tóxico y las concentraciones medidas.
- II. Estrecho margen terapéutico. Concentraciones tóxicas y terapéuticas muy cercanas.
- III. Alta variabilidad inter e intraindividual farmacocinética.
- IV. Metodología analítica disponible. Rápida obtención del resultado.
- V. Fármacos con dificultad para valorar clínicamente su eficacia o toxicidad⁶.

Actualmente se tienen fármacos que se monitorizan de forma habitual, tales como: Antibióticos, Antiarrítmicos, Citotóxicos, Neurolépticos e Inmunosupresores⁷.

1.3.2 Monitoreo de antibióticos

Es una estrategia cuyo principal objetivo es el uso racional de éstos para limitar sus efectos adversos y prevenir la multirresistencia.

Algunas recomendaciones para la monitorización de los niveles de antibióticos son⁸:

- I. Pacientes pediátricos y con edad avanzada.
- II. Pacientes críticos.
- III. Insuficiencia renal y/o hepática.
- IV. Terapia simultánea con fármacos oto y/o nefrotóxicos.
- V. Sospecha de alteraciones cinéticas.
- VI. Tratamientos prolongados.
- VII. Empleo de dosis superiores a las habituales.

1.3.3 Técnicas para el monitoreo de fármacos

1.3.3.1 Ensayos de polarización de fluorescencia (FPIA).

Se trata de un inmunoensayo homogéneo competitivo de polarización fluorescente que usa complejos antígeno-anticuerpo como medio para generar un resultado perceptible. Un anticuerpo específico reconoce la molécula de interés y se pone en contacto con la muestra biológica que contiene el analito y con una cantidad conocida de la misma molécula unida químicamente a un trazador, capaz de generar una señal mensurable, que compite por los sitios de unión en el anticuerpo con la molécula marcada. El grado de polarización de la fluorescencia depende del giro de las moléculas en disolución. Las moléculas

de pequeño tamaño, como el trazador no ligado, giran libremente a una velocidad elevada, dando lugar a un grado de polarización bajo. El complejo formado por el anticuerpo y el trazador, rotan lentamente, lo que se traduce en un elevado grado de polarización de la fluorescencia emitida. A mayor concentración del antígeno en la muestra, menor será la cantidad de trazador unido al anticuerpo, por lo que el valor de la polarización de la fluorescencia será bajo. El fluoróforo en el trazador es la fluoresceína, capaz de absorber la energía de la luz a 490 nm y liberarla posteriormente a una longitud de onda superior a 520 nm, como luz fluorescente. La proporción de moléculas marcadas unidas a los anticuerpos es inversamente proporcional a la cantidad de analito de interés presente. Son los comúnmente usados en los laboratorios clínicos, debido a que son fáciles de usar y automatizar, permiten conseguir un tiempo de respuesta corto en la emisión de resultados⁹.

1.3.3.2 Inmunoanálisis enzimático homogéneo.

Se basa en la competencia entre el fármaco presente en la muestra y el fármaco marcado con la enzima glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa por los sitios de unión al anticuerpo.

1.3.3.3 Ensayo homogéneo turbidimétrico de inmunoinhibición.

En este ensayo la diferencia con respecto a los métodos anteriores es que utiliza un reactivo de partícula de látex unido al fármaco y un anticuerpo monoclonal específico del fármaco.

1.3.3.4 Técnicas Cromatográficas.

1.3.3.4.1 Cromatografía de Gases. Permite la separación del fármaco en estudio, sus metabolitos y su diferenciación de otros fármacos coadministrados y compuestos endógenos de estructura similar. Sin embargo, se necesita la aplicación de derivatizaciones químicas para que el analito tenga volatilidad, haciendo de esta técnica difícil de implementar en los laboratorios clínicos.

1.3.3.4.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Es una técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos bajo alta presión. Por acción de una bomba cuaternaria (recíproca), se hace pasar una mezcla de compuestos, en estado líquido, en un sistema disolvente (fase móvil), la cual pasa a través de una columna cromatográfica, que contiene la fase estacionaria, a un caudal específico. El tiempo que tarda el máximo de un pico en ser eluido después de la inyección se llama tiempo de retención. La separación se realiza en base a la interacción selectiva entre los compuestos con la fase móvil y la fase estacionaria. Los principales mecanismos de interacción son: Adsorción, partición e intercambio iónico. Esta técnica cromatográfica ofrece versatilidad con necesidad de pequeños volúmenes de muestra, buena sensibilidad, especificidad y relativa facilidad de uso. Dentro de sus inconvenientes está la necesidad de personal calificado para el manejo diario en el laboratorio.

1.3.3.4.3 Detector de Espectrometría de Masas (MS). La espectrometría de masas es una técnica analítica que determina la masa molecular de compuestos eléctricamente cargados, usando la relación masa/carga (m/z) de

cada uno de ellos. Involucra la ionización de la muestra, aceleración de los iones por un campo eléctrico, separación de los iones según su m/z , detección de los iones y su correspondiente señal eléctrica. En el espectro de masas los compuestos son ionizados a partir de una pérdida o ganancia de carga (pérdida de electrones, protonación o desprotonación). La muestra es introducida a la fuente de ionización vía Cromatografía Líquida, Cromatografía de Gases o infusión directa. Aquí las gotas cargadas de la muestra son atraídas por el sistema de alto vacío. En la fuente de ionización el solvente es evaporado liberando a los iones. El espectro de masas de un compuesto se obtiene mediante la representación en un gráfico de barras de los distintos iones en que se fragmenta dicho compuesto en función de su m/z y en el que la altura de este corresponde a la intensidad relativa de los iones detectados. Se denomina pico base al ion que da la señal más intensa, el ion molecular es aquel que resulta de la pérdida o ganancia de un electrón por parte de la molécula. La MS se usa para identificar, cuantificar compuestos y elucidar la estructura de las moléculas¹⁰.

1.3.3.4.4 HPLC-MS/MS. Es actualmente una de las técnicas más utilizadas, una metodología muy versátil, robusta y sensible. La espectrometría de masas en Tándem (MS/MS) es cualquier método que involucre al menos dos etapas de análisis de masas, en conjunto con un proceso de disociación a una reacción química que cause un cambio en la masa o en la carga de un ion.

En la MS/MS se combinan dos filtros de masas cuadrupolo y las moléculas del analito diana del primer cuadrupolo se someten a una fragmentación

controlada en una celda de colisión. El total de los iones formados por la ionización se transfiere al primer filtro de masas del cuadrupolo. Aquí, la m/z del analito ionizado intacto se selecciona, todas las demás especies de iones se filtran. Los iones seleccionados que comparten una relación m/z idéntica se transfieren continuamente a la celda de colisión. En esta parte del analizador de MS se encuentra presente un gas de colisión, argón o nitrógeno. Los iones seleccionados por el primer cuadrupolo chocan con estas moléculas de gas y se fragmentan en iones del producto característico. Para los analitos se generan productos iónicos favorecidos termodinámicamente. Se ajusta la radiofrecuencia del segundo cuadrupolo analítico, de manera que solo pase un fragmento iónico seleccionado, mientras que todas las demás especies de fragmento iónico se filtran. Por lo tanto, un definido “ion hijo” (ion precursor) de un “ion padre” (ion molecular) finalmente alcanza el detector de iones.

La selección de masas del primero y segundo cuadrupolo, definen la respectiva “transición de masa” y se puede cambiar dentro de las fracciones de segundo, por lo tanto, se pueden monitorear un gran número de diferentes transiciones en masa en paralelo con una ejecución analítica que permite la cuantificación de múltiples analitos. Al menos una transición de masa de un analito objetivo y del respectivo compuesto estándar interno se registran simultáneamente, se pueden registrar hasta 100 transiciones de diferentes compuestos en el modo llamado Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) dentro de una serie cromatográfica. Varias combinaciones de diferentes técnicas de generación de iones y análisis de iones pueden llevarse a cabo como ESI,

analizadores de cuadrupolo de una sola etapa y de tres etapas, analizadores de trampa de iones e instrumentos híbridos que combinan una trampa de iones y un cuadrupolo. El modo MRM, con los cuadrupolos que se alternan entre los diferentes ajustes del filtro de modo estático, se utiliza para la cuantificación más sensible de compuestos conocidos. Se obtiene una muy buena relación señal-ruido, ya que prácticamente todos los iones de fondo se filtran. La especificidad de MRM es alta y debido a ello la separación cromatográfica se puede minimizar en comparación con otros métodos de HPLC con técnicas de detección convencionales y menos específicas¹¹.

1.4 Antibióticos

Son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas, actuando por distintos mecanismos en función de su naturaleza y su objetivo es bloquear la proliferación de las bacterias inhibiendo alguno de los pasos en su desarrollo¹².

El uso de antibióticos se lleva a cabo según las recomendaciones estándar y la información epidemiológica local sobre los patógenos comúnmente aislados en cada Unidad de Cuidados Intensivos, dado al desconocimiento de múltiples factores que condicionan la administración de dosis correcta de los mismos. La administración adecuada pretende limitar las consecuencias no deseadas como la aparición de resistencia, eventos adversos y el alto costo, sin afectar negativamente la calidad de la atención¹³.

1.4.1 Farmacocinética y Farmacodinamia de antimicrobianos

La farmacocinética es el estudio de la relación entre la dosis administrada y la concentración observada en el cuerpo y tejidos. La farmacodinamia es el estudio de la relación entre la concentración y el efecto (la capacidad de matar o inhibir el crecimiento bacteriano). Los antimicrobianos se clasifican mediante diversos índices PK/PD que describen su eficacia (ver TABLA 1)¹⁴.

TABLA 1. Índice farmacodinámico correlacionado con máxima eficacia de algunos antimicrobianos.

	T_{>CMI}	C_{max}/CMI	AUC₀₋₂₄/CMI
Antimicrobianos	Betalactámicos	Aminoglucósidos	Fluoroquinolonas
	Carbapenems	Metronidazol	Azitromicina
	Linezolid	Fluoroquinolonas	Tetraciclinas
	Eritromicina	Telitromicina	Glyco péptidos
	Claritromicina	Daptomicina	Tigeciclina
	Lincosamida		Linezolid

1.4.2 Aminoglucósidos

Son fármacos que se utilizan con frecuencia en infecciones bacterianas causadas por organismos Gram negativos y tratamientos para diversos trastornos genéticos¹⁵.

Son antibióticos producidos por *Streptomyces spp* y *Myromonospora spp*. La estructura general consiste en un núcleo de aminociclitol (estreptamina, 2-desoxiestreptamina o estreptidina) ligado a aminoazúcares por enlaces glucosídicos. Son cationes de carácter básico, fuertemente polares¹⁶, debido a

este carácter son muy solubles en agua, presentan una absorción gastrointestinal menor al 1%, penetran escasamente la barrera hematoencefálica, por tanto, no alcanzan concentraciones terapéuticamente útiles en LCR y meninges, así como también en líquido prostático y en el parénquima pulmonar, tienen una unión a proteínas del 0-11%¹⁷. El tiempo de vida media está correlacionado inversamente proporcional con la edad postnatal y el peso corporal¹⁸. La nefrotoxicidad y ototoxicidad son los principales efectos adversos, siendo la ototoxicidad irreversible y se presenta después de los 7 días de tratamiento¹⁹.

1.4.2.1 Actividad antimicrobiana.

Los Aminoglucósidos tienen actividad *in vitro* contra *Pseudomonas ssp*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus* indol-positivas e indol-negativas, *Providencia spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Acinetobacter spp* y algunas cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*²⁰. *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos principalmente asociados con infecciones nosocomiales potencialmente mortales²¹, puede causar infecciones graves en pacientes con trasplante de órganos, quemaduras e inmunocomprometidos²².

1.4.2.2 Indicaciones terapéuticas.

Debido a su espectro de acción, los Aminoglucósidos están indicados para el tratamiento de fibrosis quística, episodios neutropénicos febriles en pacientes con cáncer, cirugía abdominal, endocarditis bacteriana, infecciones complicadas del tracto urinario e intraabdominales, osteomielitis y septicemia^{23, 24}. La

profilaxis quirúrgica es la razón más frecuente de mal uso de antibióticos en niños y adultos. Entre el 42 a 67% de los antibióticos son mal empleados, debido a dosis incorrecta, fármaco erróneo, tiempo de inicio, duración o indicación inapropiada²⁵.

Los Aminoglucósidos se combinan frecuentemente con otros antibióticos como betalactámicos para extender el espectro de actividad antimicrobiana, obteniendo un efecto sinérgico y prevenir la aparición de resistencia²⁶.

1.4.2.3 Mecanismo de acción.

Los Aminoglucósidos se unen a los compuestos aniónicos que se encuentran en la superficie de las bacterias Gram negativas, como lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas de la membrana externa. En las bacterias Gram positivas se unen a ácidos teicoicos y fosfolípidos. Estas interacciones producen un aumento de la permeabilidad, que da como resultado la penetración de algunas moléculas del fármaco en el espacio periplásmico, este mecanismo es independiente de energía. El siguiente proceso es la fase dependiente de energía, en la cual, un pequeño número de moléculas del antibiótico alcanzan al citoplasma con el apoyo de un sistema de transporte de electrones. Dentro del citoplasma bacteriano se unen a la subunidad 30S ribosómica, cambiando la configuración del sitio A, a una que se parece a la inducida por la interacción entre ARN-t y ARN-m afines, lo que reduce las capacidades de secuenciación, resultando proteínas mal traducidas. Como consecuencia, las proteínas de membrana citoplasmáticas aberrantes inducen

daño a la integridad de la membrana citoplasmática facilitando la entrada de moléculas de Aminoglucósido en cantidades abundantes. El alto número de moléculas dentro de la célula produce altos niveles de errores en la síntesis de proteínas que conducen a un mayor daño en la membrana citoplasmática, permitiendo una tasa de captación aún mayor que finalmente da como resultado la muerte de la célula^{27,28}.

1.4.2.4 Modo de administración.

Los Aminoglucósidos se deben administrar por vía intravenosa, en infusiones de 30 minutos, o intramuscular. No se recomiendan las inyecciones subcutáneas debido a que puede haber necrosis en el sitio de la inyección²⁹.

1.4.2.5 Régimen de administración.

El régimen de dosificación de Aminoglucósidos puede ser con ampliación de intervalo (cada 24 horas o más) o dosis múltiple diaria, también llamada tradicional (cada 8-12 horas).

La dosificación una vez al día se considera eficaz y probablemente menos nefrotóxica que la dosificación tradicional. El uso de dosificación de intervalo se basa en cuatro conceptos centrales. El primero es que la actividad bactericida se correlaciona positivamente con sus concentraciones máximas, así como con los resultados clínicos. El segundo concepto es el efecto post antibiótico, que al final del intervalo de dosificación, el nivel sérico del Aminoglucósido está debajo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del patógeno objetivo, aprovechando este fenómeno. El tercer concepto es la reducción de la resistencia adaptativa, ya que este tipo de resistencia se asocia con una

reducción en la actividad antibiótica cuando se administran dosis frecuentes, mientras que las concentraciones detectables de Aminoglucósidos aún están presentes, por lo tanto, la dosificación de intervalo prolongado podría mejorar la eficacia antibacteriana al permitir tiempo para la desactivación de la resistencia adaptativa. El cuarto concepto es la presencia de acumulación tubular renal saturable de Aminoglucósido, donde la dosificación de intervalo prolongado disminuye la acumulación y tendría un potencial nefrotóxico menor. Sin embargo, hay algunas condiciones en las que se podría considerar la dosificación tradicional^{30, 31,32}.

1.4.2.6 Consideraciones en pacientes pediátricos.

Los Aminoglucósidos son fármacos que se utilizan con frecuencia para tratar infecciones bacterianas en infantes recién nacidos, jugando un rol importante en el manejo de infecciones serias en Pediatría o en la Unidad de Cuidados Intensivos. Debido al estrecho índice terapéutico y a las grandes variaciones interindividuales en los parámetros farmacocinéticos de Aminoglucósidos reportados para estos pacientes, un óptimo e individualizado régimen de dosificación debería ser propuesto³³.

Desde el nacimiento hasta la edad adulta se producen una serie de modificaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que afectan los procesos farmacocinéticos, así como también algunos aspectos farmacodinámicos que influyen la acción de los fármacos, la biosíntesis enzimática, la producción y distribución de receptores. Estas modificaciones son máximas en la época

perinatal con grandes cambios y necesidades adaptativas que condicionan la respuesta farmacocinética y de los receptores. El conocimiento acabado de estos cambios permite un mayor éxito en la terapia farmacológica³⁴.

En el recién nacido el agua representa del 70-75% del peso corporal, en comparación con el 50-55% en adultos, los infantes tienen menos tejido graso que los adultos, teniendo el compartimento extracelular acuoso más grande (40% del peso corporal), estas características afectan el volumen de distribución de los Aminoglucósidos. La presencia de infección tiene un efecto adicional en el volumen de distribución, así como varias condiciones clínicas que son comunes en pacientes críticamente enfermos, resultando en una expansión del espacio extracelular y que puede conducir a una baja concentración del fármaco con las dosis usuales.

La concentración plasmática de creatinina durante los primeros días refleja la función renal materna, esta sigue aumentando después del nacimiento, donde la tasa de filtración glomerular es baja. En los recién nacidos entre 28 y 40 semanas de gestación es de un 30-50% del valor adulto, esto se refleja en el tiempo de vida media de un Aminoglucósido, dado a que éstos son eliminados sin cambio por el riñón, arriba de un 90% por filtración glomerular. La función renal inmadura en esta etapa requiere una administración menos frecuente (cada 12 a 24 h). Ciertos estados de enfermedad, como la fibrosis quística, requieren una administración más frecuente debido a la eliminación rápida del fármaco³⁵.

1.4.2.7 Efectividad terapéutica.

Efectividad se refiere a la evaluación de si una intervención hace más bien que daño, bajo condiciones usuales, midiendo el efecto de una intervención en relación a los recursos que estas consume y la evaluación riesgo-beneficio o costo-beneficio. Los estudios de efectividad tratan de ayudar a pacientes y clínicos a tomar decisiones, ya que se analiza si la intervención que funcionó en condiciones ideales lo hace en condiciones usuales en pacientes con un amplio rango de características³⁶.

1.4.2.8 Objetivo PK/PD en la terapia con Aminoglucósidos.

1.4.2.8.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Es una medición *in vitro* del efecto del antibiótico contra una bacteria; representa la concentración más baja del fármaco que inhibe el crecimiento de un microorganismo³⁷.

Para el uso óptimo de los Aminoglucósidos es importante comprender los factores que son determinantes de la eficacia terapéutica. Estudios previos en poblaciones clínicas han demostrado que un determinante de la eficacia está relacionado con el organismo infeccioso. La CMI *in vitro* para el organismo infectante y la respuesta al tratamiento con Aminoglucósidos están inversamente asociados³⁸.

1.4.2.8.2 Marcador de efectividad terapéutica. Para antibióticos con una actividad bactericida dependiente de concentración, la relación C_{\max}/CMI se ha utilizado como un marcador de efectividad terapéutica. El efecto terapéutico es el más alto si la relación C_{\max}/CMI es de al menos 8-10³⁹.

1.4.2.9 Efecto post antibiótico.

Es la inhibición del crecimiento bacteriano después de que las concentraciones del Aminoglucósido hayan disminuido por debajo de la CMI para el microorganismo aislado (ver Figura 1).

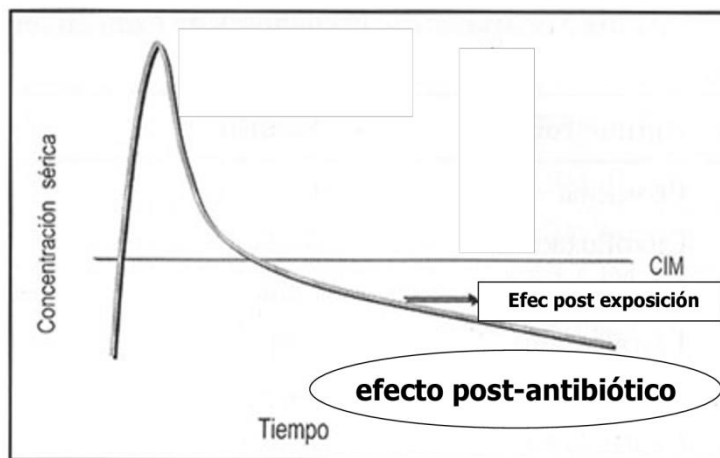


Figura 1. Efecto post-antibiótico⁴⁰

1.4.2.10 Seguridad de la terapia con Aminoglucósidos.

Los riesgos de toxicidad renal y ototoxicidad aumentan para el tratamiento por más de 5-7 días, incluso en sujetos sanos.

1.4.2.10.1 Toxicidad renal. Se estima que hasta el 25% de todos los pacientes que reciben terapia con Aminoglucósidos desarrollan nefrotoxicidad. La toxicidad tubular renal es el mecanismo principal por el cual este grupo farmacológico causa nefrotoxicidad.

En la membrana del túbulo proximal de la nefrona, estos agentes se unen a fosfolípidos ácidos, favorecida esta unión por el receptor megalina

(lipoproteína de baja densidad que participa en la reabsorción tubular de varias proteínas), posteriormente sufren endocitosis y se concentran en los lisosomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico, una vez alcanzado el umbral, se vacían en el citosol y actúan sobre la mitocondria para inducir la apoptosis y la necrosis, inhibiendo una cantidad de transportadores en el túbulo proximal, lo que afecta la reabsorción tubular y compromete la viabilidad celular. Se produce un aumento en la excreción urinaria de calcio, magnesio, proteínas y otros aniones orgánicos, a medida que el daño continúa, se puede observar una mayor excreción de potasio y sodio junto con aumentos en la creatinina sérica.

En el glomérulo, los Aminoglucósidos causan aumento en los niveles de calcio intracelular induciendo la contracción de las células mesangiales del músculo liso, lo que conduce a una disminución de la Tasa de Filtración Glomerular (TFG). Los mecanismos por los cuales aumenta el calcio intracelular son la inducción de la secreción del factor activador de plaquetas, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la producción de vasoconstrictores como la endotelina 1 y el tromboxano A2 y aumento de las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo.

El mecanismo final de toxicidad renal es una reducción en el flujo sanguíneo renal secundario a una mayor resistencia vascular en el lecho vascular renal. Esto ocurre inmediatamente después de que se ha producido daño en el túbulo proximal, como medio para evitar la pérdida de líquidos y electrolitos^{41,42}(ver Figura 2)⁴³.

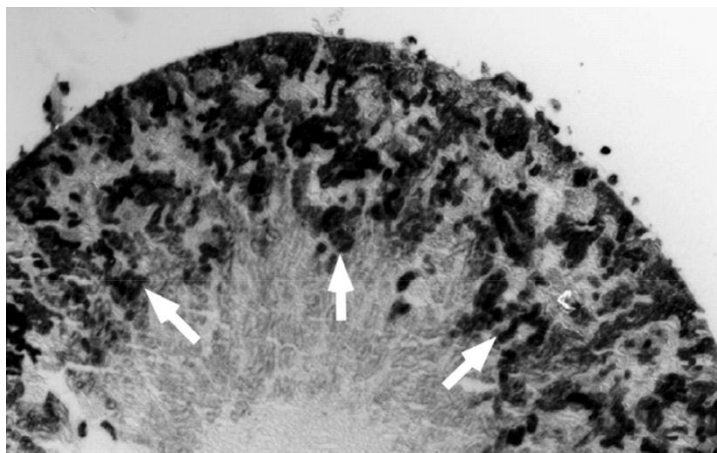


Figura 2. Acumulación de Gentamicina en Lisosomas del túbulo proximal.

1.4.2.10.2 Ototoxicidad. La pérdida auditiva permanente ocurre como resultado del daño causado a las células ciliadas sensoriales en el oído interno, especialmente en las células ciliadas externas basales de alta frecuencia. Los efectos incluyen pérdida auditiva neurosensorial severa, bilateralmente severa, de alta frecuencia e hipofunción vestibular temporal.

Todos los Aminoglucósidos pueden afectar tanto la función auditiva como la vestibular. La toxicidad depende de la concentración del fármaco en la endolinfa. La acumulación surge sobre todo cuando son altas sus concentraciones en plasma. Es lenta la difusión retrograda hacia la corriente sanguínea; la vida media de los Aminoglucósidos es cinco a seis veces mayor en los líquidos del oído que en el plasma.

Dado que existen mecanismos compensatorios para las fallas vestibulares y no para la falta de audición, ésta última es mucho más grave. El grado de

disfunción permanente guarda relación con el número de neuronas ciliadas sensitivas destruidas, y esto depende de la exposición sostenida al fármaco⁴⁴.

TABLA 2. Factores de riesgo para el desarrollo de toxicidad renal^{45, 46}.

Relacionados con el uso de aminoglucósidos	Específicos del tratamiento	Asociados a la medicación
Edad avanzada	Mayor duración del tratamiento	Antiinflamatorios no esteroideos
Disminución de la función renal inicial	Administración de dosis más altas	Diuréticos
Disfunción hepática	Administración en dosis divididas	Anfotericina B
Acidosis metabólica		Cisplatino
Hipovolemia		Vancomicina
Hipotensión		Cefalosporinas
		Inhibidores de la ECA
		Medios de radio contraste
		Agentes antivirales
		Antifúngicos

1.4.2.11 Resistencia Antimicrobiana.

1.4.2.11.1 Mecanismos de resistencia a Aminoglucósidos. Las bacterias desarrollan varios mecanismos de resistencia mediante enzimas modificadoras de Aminoglucósidos que catalizan la inactivación por distintas reacciones (ver TABLA 3)⁴⁷.

TABLA 3. Enzimas modificadoras de Aminoglucósidos.

Tipo de inactivación	Enzima
Acetilación	Aminoglucósido acetiltransferasas (AAC-I, AAC-Ib)
Fosforilación	Aminoglucósidos fosfotransferasas (APH)
Adenilación	Aminoglucósido nucleotidil transferasa (ANT)

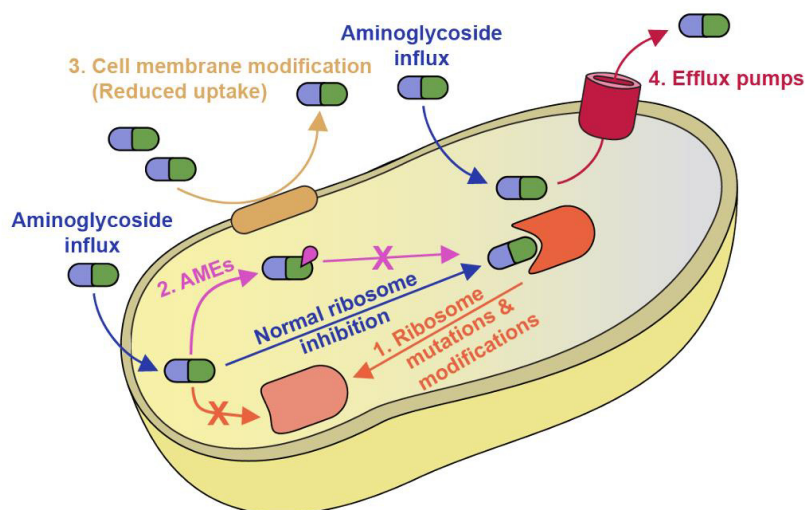


Figura 3. Mecanismo de resistencia de aminoglucósidos⁴⁸.

La Aminoglucósido Acetiltransferasa-Ib, es la enzima que más se encuentra en aislados Gramnegativos del género *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*.

En base a la urgencia de la necesidad de nuevos antibióticos, la OMS anunció una lista de bacterias, en febrero del 2016, con prioridad crítica:⁴⁹

- I. *Acinetobacter baumannii*, Carbapenems-resistente.
- II. *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenems-resistente.

III. *Enterobacteriaceae*, Carbapenems-resistente, cefalosporinas de tercera generación-resistentes.

1.4.2.12 Resistencia adaptativa.

Es una forma reversible de resistencia que ocurre cuando la bacteria puede disminuir la cantidad de Aminoglucósido que transporta activamente a la célula. Este tipo de resistencia se puede desarrollar entre 1 y 2 horas después de la exposición inicial a un Aminoglucósido y posteriormente desaparecerá varias horas después de que el antibiótico ya no esté presente. La resistencia se asocia con una reducción en la actividad antibiótica cuando se administran dosis frecuentes, mientras que las concentraciones de Aminoglucósido aún están presentes, ver Figura 4.

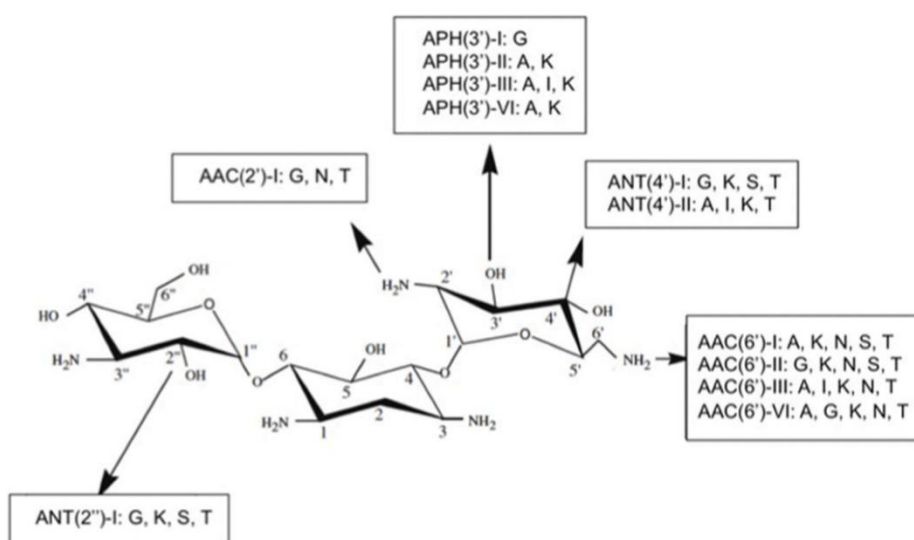


Figura 4. Representación de diferentes tipos de enzimas modificadoras de antibióticos y su nomenclatura. A, Amikacina; G, Gentamicina; I, Isepamicina; K, Kanamicina; N, Netilmicina; S, Sisomicina; T, Tobramicina; ACC, Acetiltransferasa; ANT, Adeniltransferasa; APH, Fosfotransferasa⁵¹.

1.4.3 Amikacina

Es un Aminoglucósido semisintético, introducido en 1977. Es el más ampliamente utilizado debido a que es refractario a la mayoría de las enzimas modificadoras de Aminoglucósidos. Se sintetizó por acilación con la cadena lateral L-(-)-γ-amino-α-hidroxibutirilo en el grupo amino C-1 del resto desoxiestreptamina de la Kanamicina A. Tiene un efecto post antibiótico alrededor de 0.5 a 7 horas, en relación con la concentración del antibiótico y el tiempo de exposición a éste⁵².

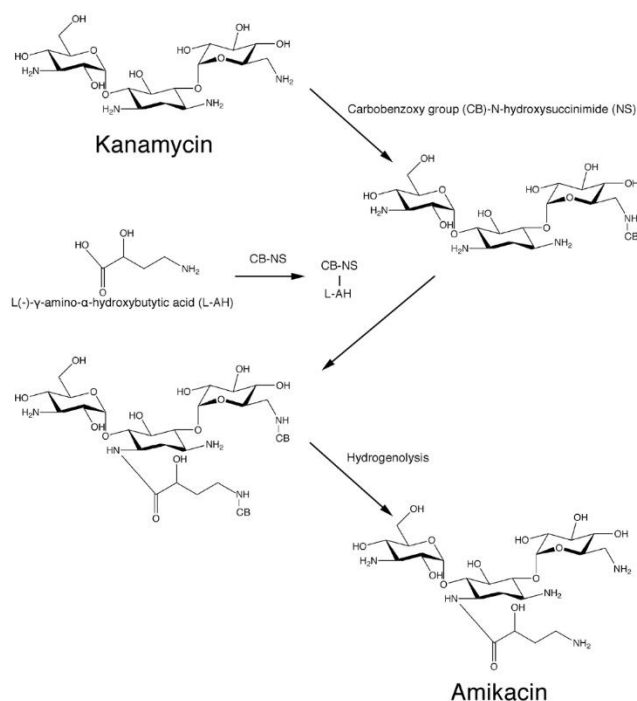


Figura 5. Síntesis de Amikacina a partir de la Kanamicina A⁵³.

TABLA 4. Propiedades físicas y químicas de Amikacina (ver Anexo E) ⁵⁴.

Fórmula molecular	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$
Nombre IUPAC	(2S)-4-amino-N-[(1R, 2S, 3S, 4R, 5S) -5-amino-2-[(2S,3R, 4S, 5S, 6R) -4-amino-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil) oxan-2-il] -oxi-4-[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R) -6- (aminometil) -3,4,5-trihidroxioxan-2-il] oxi 3-hidroxiciclohexil] -2-hidroxibutanamida.
Masa molecular	585.2857 g/mol
Log P	-7.4
Log S	-0.5
pKa	9.7

1.4.3.1 Farmacología.

1.4.3.1.1 Parámetros Farmacocinéticos.

TABLA 5. Parámetros Farmacocinéticos de Amikacina en adultos con función renal normal^{55, 56}.

Absorción	IM, IV. Pobre absorción oral y tópica. Poco absorbido por los riegos de la vejiga y la administración intratecal.
Distribución	Unión a proteínas: 0-11%
	Volumen de distribución 24 L
Metabolismo	No se metaboliza
Eliminación	En orina, por filtración glomerular (94-98%)
	Tiempo de vida media: 2-3 h
	Aclaramiento: 100 mL/min
Estado estacionario	Se alcanza a las 36 h

El tiempo de vida media de Amikacina en neonatos con una edad posmenstrual menor a 30 semanas es de 7-14 h y de 4-7 horas en neonatos con una edad posmenstrual mayor a 40 semanas⁵⁷.

1.4.3.1.2 Dosificación y Monitoreo clínico.

TABLA 6. Obtención de muestras e Intervalos Terapéuticos recomendados⁵⁸.

	Tiempo de Muestreo	Niveles esperados
Adultos: Función renal normal.	Dosis múltiple diaria Pico: Q8h: 30 min antes de la 3ª dosis. Q12H: 30 min antes de la 3ª dosis. Q24-48h: 30 min antes 2ª dosis.	Dosis múltiple diaria Dosis: 5-7 mg/kg, Q12h. Pico: 20-35 mg/L. Dosis: 15 mg/kg, Q24h. Pico: 35-50 mg/L. Dosis: 20 mg/kg, Q24, 36, 48h. Pico: 40-60 mg/L.
	Dosificación con ampliación de intervalo. Pico: 30 min después de finalizar la infusión de ½ hora.	Dosificación con ampliación de Intervalo: Dosis: 15-20 mg/kg, Q24 h. Pico: 30-40 mg/L.
Neonatos y Lactantes	Se puede tomar un punto intermedio: 8-12 h post-perfusión, si no se puede extraer pico. Anotar la hora exacta de la extracción.	Pico: 24-35 mg/L. 12 h post perfusión: 5-20 mg/L.

TABLA 7. Dosificación de Amikacina recomendada para neonatos^{59, 60, 61,62}.

Pacientes	Dosis de carga	Dosis de mantenimiento
Primera semana de vida	10 mg/kg	7.5 mg/kg, Q24h.
> primera semana, <4 semanas de vida	17 mg/kg	15 mg/kg, Q24h o 7.5 mg/kg Q12h.
< 2kg y < 4 semanas de vida.		10 mg/kg, Q24h.
> 4 semana de vida.		15 mg/kg, Q24h o 7.5 mg/kg Q12h.
Fibrosis quística		30 mg/kg, Q24h.

La Amikacina se recomienda infundir durante, al menos, 30 a 60 minutos en adultos. En infantes se recomienda una infusión de 1 a 2 horas⁶³.

1.4.3.1.3 Ajuste de dosis. El ajuste de dosis se realiza en base a la edad, peso y aclaramiento de creatinina⁶⁴. La tasa de filtración glomerular (TFG) es el mejor estimador de la función renal⁶⁵, para pacientes pediátricos se estima mediante la Fórmula de Schwartz⁶⁶.

$$\text{TFG (mL/min x 1.73 m}^2\text{)} = (\text{K x talla}) / \text{Creatinina sérica}$$

Donde K, toma los siguientes valores: 0.35, prematuros; 0.45, niños a término; 0.5, lactantes; 0.55, niños; 0.7, adolescentes.

Para alcanzar la máxima eficacia terapéutica con un mínimo de efectos adversos, se debe tomar en cuenta la función de parámetros como: información sobre el perfil cinético del fármaco, objetivo terapéutico perseguido, proceso patológico tratado, variables demográficas, fisiopatológicas y clínicas del paciente⁶⁷.

1.4.3.1.4 Indicaciones terapéuticas de Amikacina. Está indicada para el tratamiento de infecciones severas contra *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus* indol-positivas e indol negativas, *Providencia spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Acinetobacter spp*, así como algunas cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*⁶⁸. En el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana están reportados los puntos de corte para la CMI de antibióticos para microorganismos⁶⁹.

1.4.3.1.5 Consideraciones en población pediátrica. Una dosis neonatal apropiada necesita integrar los cambios del desarrollo en este periodo que se refleja por variables que influyen la disposición del fármaco, éstas pueden incluir edad gestacional, edad postnatal, concentración de creatinina, aclaramiento, volumen de distribución, función hepática y renal, estatus inmune, enfermedades y fármacos asociados, coadministración de otros medicamentos nefrotóxicos y ototóxicos, soporte cardiovascular y ventilatorio⁷⁰.

Los pacientes pediátricos con fibrosis quística poseen una serie de cambios farmacocinéticos que alteran la eficacia de Amikacina, la mayoría de los antibióticos tienen una escasa penetración en el tejido pulmonar, sólo un 40% de la concentración en sangre de Amikacina llega al pulmón⁷¹.

En nuestro país la sepsis es una de las principales causas de morbilidad neonatal, la madurez inmunológica característica del neonato es quizá uno de los principales motivos por los que se presenta con más frecuencia en esta población. La sepsis neonatal se asocia a procedimientos

invasivos, virulencia de los gérmenes multirresistentes y la sobre exposición a los antibióticos, en este estado fisiopatológico el volumen de distribución tiende a ser grande, afectando la farmacocinética de Amikacina⁷².

Otro punto que considerar es el efecto de la co-medicación, esto se puede observar con la Furosemida y la Dopamina (ampliamente utilizados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales) tienen un efecto sobre la filtración glomerular. A través de la activación selectiva de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2, la Dopamina en dosis bajas induce un aumento del 20-40% en el flujo sanguíneo renal. La tasa de filtración glomerular muestra un aumento del 5-20% y conduce a concentraciones subterapéuticas de Amikacina. La Furosemida es un diurético del asa que inhibe la reabsorción del cloruro y se elimina en el líquido tubular para ejercer su efecto diurético, causando un aumento rápido de la diuresis, teniendo un aumento en el aclaramiento de la Amikacina^{73, 74}.

1.4.3.1.6 Resistencia a Amikacina. El principal mecanismo de resistencia es mediante acetilación por la Aminoglucósido 6-N-acetiltransferasa tipo Ib, enzima codificada por un gen que se encuentra en integrones, transposones, plásmidos y cromosomas de bacterias Gramnegativas. La tasa de resistencia a Amikacina contra 586 cepas de *P. aeruginosa* es del 20.5% en América Latina⁷⁵.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

En el Instituto Nacional de la Nutrición de la Ciudad de México, mediante un estudio prospectivo en 1989, Contreras *et al.*, estudiaron 113 pacientes hospitalizados tratados con Amikacina, durante 48 h como mínimo, con una administración IV de 5 mg/kg en infusión de 30 min, la dosis se ajustó de acuerdo al aclaramiento de creatinina, donde determinaron los niveles plasmáticos valle y pico para predecir la nefrotoxicidad. Obtuvieron que trece pacientes (11.5%) desarrollaron toxicidad renal, con un aumento significativo en los niveles pico y valle entre 48 y 96 h. El riesgo de nefrotoxicidad más alta se observó en pacientes con incrementos mayores en C_{max} de $1\mu\text{g/mL}$ ⁷⁶.

En el año 2000, Lugo-Goyta *et al.*, compararon el rendimiento predictivo de un programa Bayesiano que incorporó un modelo farmacocinético poblacional con y sin covariables severas en pacientes con sepsis de la Unidad de Cuidados Intensivos. Se registró la información demográfica, clínica, fisiológica

y farmacocinética de 62 pacientes y fue analizada retrospectivamente. El modelo se desarrolló mediante estimación bayesiana de parámetros farmacocinéticos, la selección de covariables se dio por análisis de los componentes principales y la selección final de las mismas mediante regresión lineal múltiple paso a paso. La predicción de este modelo se comparó con un modelo de población general sin covariables, resultando en el análisis de regresión lineal múltiple que el Puntaje de Evaluación Aguda Fisiológica y de Salud Crónica (APACHE II) fue el determinante más importante para el volumen de distribución de Amikacina (1.5 L/kg), la presión positiva al final de la espiración (PEEP) y el uso de catecolaminas fueron los predictores más importantes para el aclaramiento de Amikacina y de creatinina, mostrando que es relevante considerar covariables relacionadas con el estado fisiopatológico y las medidas terapéuticas, teniendo un mejor control de los parámetros farmacocinéticos en pacientes que exhiben condiciones fisiológicas rápidamente cambiantes⁷⁷.

Posteriormente, en el 2004, en un estudio prospectivo, Charles *et al.*, compararon la incidencia de nefrotoxicidad y ototoxicidad asociados con dos regímenes de dosificación de Amikacina: 15 y 25 mg/kg, tres veces por semana, por vía intravenosa, en 87 pacientes con tuberculosis infecciosa o por micobacterias no tuberculosas, obteniéndose que la ototoxicidad no se asoció con el tamaño o la frecuencia de la dosis de Amikacina, pero se asoció con la edad avanzada y la duración del tratamiento y una mayor dosis total recibida,

así como su ocurrencia fue independiente de nefrotoxicidad o toxicidad vestibular⁷⁸.

Fidel-Rimon *et al.*, en el 2006, estudiaron la eficacia microbiológica y clínica, y la seguridad del uso de Piperacilina/Tazobactam en asociación con Amikacina en recién nacidos con sepsis, mediante un análisis retrospectivo de 1999 al 2003, donde la erradicación de los patógenos se logró dentro de 48 a 72 h de terapia en 95% de los organismos Gram negativos, sin embargo, encontraron que la incidencia de eventos adversos asociados con el uso de Piperacilina/Tazobactam es mayor cuando se administra junto con Amikacina que cuando se administra en monoterapia⁷⁹.

Akondi *et al.*, en pacientes pediátricos estimaron un modelo farmacostatístico para evaluar la farmacocinética poblacional en el 2008, el modelo incluyó las variables edad, peso corporal, altura, sexo y aclaramiento de creatinina para individualizar la dosis de carga y de mantenimiento en pacientes pediátricos. Además, analizaron 74 concentraciones de Amikacina en estado estable de 42 pacientes entre 1 y 12 años, donde observaron que el peso corporal y la edad tienen una influencia significativa como una covariable sobre el aclaramiento de creatinina⁸⁰.

En un estudio retrospectivo, Barrantes-González *et al.*, durante 8 años (2002-2010) en un hospital universitario, con 164 pacientes de distintas etnias (7 asiáticos, 135 caucásicos, 11 hispanos y 11 magrebíes), observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de Amikacina, evidenciándose concentraciones inferiores en la población magrebí, como resultado de su mayor aclaramiento de creatinina. Todos los pacientes estuvieron en tratamiento endovenoso en un régimen de ampliación de intervalo⁸¹.

Duszynska *et al.*, realizaron un estudio de 20 camas de la UCI, en el Hospital de la Universidad de Wroclaw, Polonia, entre mayo del 2009 y mayo del 2012. Se incluyeron 63 pacientes, adultos mayores de 18 años con sepsis grave o choque séptico, se les administró una dosis de carga de 18 a 30 mg/kg, el régimen diario se adoptó mediante la monitorización terapéutica de la concentración pico y valle de Amikacina. Las concentraciones se ajustaron a una relación C_{max}/CIM del patógeno aislado, de al menos 8. Once pacientes (17%) no requirieron ajuste de dosis o ajuste del intervalo durante el tratamiento. La curación clínica y la erradicación microbiológica fueron mayores en los pacientes con una C_{max}/CMI óptima inicial. En pacientes con insuficiencia renal antes del tratamiento se asoció con un descenso mayor de la función renal⁸².

Paul *et al.*, en el 2014, examinaron ensayos clínicos que compararon el tratamiento intravenoso con un betalactámico versus el tratamiento con un betalactámico más un Aminoglucósido, encontrando que la nefrotoxicidad fue menos frecuente con la monoterapia, además de que la terapia combinada no evitó el desarrollo de infecciones secundarias⁸³.

La farmacocinética de Aminoglucósidos está alterada en pacientes con lesiones por quemaduras, incluido un aumento de aclaramiento y volumen de distribución. En el 2015, Yu *et al.*, evaluaron y compararon las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos de Amikacina en pacientes pediátricos con y sin lesiones por quemaduras para identificar posibles diferencias entre ambos. Pacientes con sepsis documentada o sospechada de herida por quemadura mayores de 28 días y menores de 18 años, recibieron una dosis media de 16 mg/kg con una media de administración IV c/8 horas. Mediante un modelo de compartimento único con eliminación de primer orden se realizó un análisis de las covariables edad, sexo, talla, peso, creatinina sérica, el % del área total de la superficie corporal quemada y la cantidad de tiempo transcurrido desde que ocurrió la lesión por quemaduras, describiendo bien la farmacocinética de Amikacina para ambos grupos. La eliminación de Amikacina fue significativamente mayor en los pacientes con lesiones por quemaduras que en los pacientes sin quemaduras (7.22 frente a 5.36 L/h), el volumen de distribución también aumentó significativamente en pacientes con lesiones por quemaduras (22.7 frente a 18.7 L), esto puede deberse a un incremento en el flujo sanguíneo en los riñones más allá de 48 horas después de la lesión por

quemaduras y las infusiones de líquidos. El peso influyó significativamente en la farmacocinética de Amikacina para ambos grupos⁸⁴.

En un análisis multivariado, Allou *et al.*, en el 2016 en pacientes mayores de 18 años con sepsis severa y choque séptico, tratados con una dosis de Amikacina de 30 mg/kg, se encontró que los factores independientemente asociados con una alta mortalidad fueron la edad y altas dosis de norepinefrina, además los pacientes con una $C_{max} > 80$ mg/L también se asociaron con una alta incidencia de mortalidad. Las principales bacterias aisladas en el estudio fueron *P. aeruginosa* en un 19.1%, *Enterobacter spp* 16.7%, y *E. coli* 13.9%⁸⁵.

La prescripción de Aminoglucósidos según la información microbiológica no solo puede mejorar su eficacia sino reducir la incidencia de microorganismos resistentes. En un hospital del sur de Irán, Namazi *et al.*, en un estudio farmacoepidemiológico incluyeron pacientes que recibieron Amikacina intravenosa, se recogieron para un análisis estadístico parámetros clínicos y paraclínicos como la tasa de filtración glomerular, cultivo, sensibilidad microbiana, recuento de leucocitos y fiebre. Los pacientes se consideraron como curados si lograban tanto la resolución de la temperatura como el recuento de leucocitos, con la eliminación de los síntomas de la infección durante el tratamiento. Se detectó nefrotoxicidad en el 19% de los pacientes, la adherencia al uso de Amikacina fue del 48%, siendo las causas principales el

método inadecuado de dosificación, mala monitorización del paciente y la ignorancia a los datos microbiológicos. Además, las concentraciones séricas máximas estaban por debajo del rango terapéutico en el 52.5% de los pacientes y solo el 38% obtuvieron las concentraciones séricas máximas deseadas⁸⁶.

Factores como la localización y el tipo de infección, presencia de enzimas inactivadoras de antibióticos, condiciones ambientales (pH, pO₂, pCO₂) deben ser considerados en la terapia con Aminoglucósidos, Rylander *et al.*, observaron esta influencia en un estudio *in vivo* en conejos infectados y no infectados tratados con Amikacina, donde hubo una reducción en las concentraciones de Amikacina en suero de conejos infectados, así como pO₂ y pH bajos y alto pCO₂, en comparación con los conejos no infectados⁸⁷.

Los cambios fisiopatológicos que ocurren en la Asfixia Perinatal Tratados con Hipotermia (PATH) afecta la eliminación de Aminoglucósidos. En un estudio retrospectivo en el 2017, Cristea *et al.*, cuantificaron y evaluaron las diferencias en la farmacocinética de Amikacina en recién nacidos con PATH y sin PATH por sospecha de septicemia, para proponer recomendaciones de dosificación adecuada. Estimaron los parámetros aclaramiento, volumen de distribución y aclaramiento intercompartamental, como covariables, el tratamiento hipotérmico, peso al nacer, peso actual, edad postnatal e Ibuprofeno. Resultó que el aclaramiento en neonatos con PATH disminuyó 40.6% en comparación

con el aclaramiento en neonatos sin PATH, sin cambios en el volumen de distribución. Los resultados podrían deberse a la insuficiencia renal inducida por asfixia con o sin la influencia de la hipotermia terapéutica que se utiliza como tratamiento de atención. Se propuso para los pacientes con PATH utilizar un régimen posológico mayor de 12 h⁸⁸.

Por otra parte, Oertel *et al.*, en el 2004 desarrollaron un método analítico específico para la cuantificación de Amikacina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Poroxina, Momicina y Tobramicina en suero humano. La preparación de las muestras se realizó mediante SPE en cartuchos Oasis MCX. Utilizaron una columna Hilic de 100 x 2.1 mm, aplicando elución con gradiente, para la separación por HPLC. El sistema EM/EM usado fue con ESI, ionización positiva a 300 °C, con un voltaje capilar de 3200 V, se usó MRM para la determinación de los analitos. En la cuantificación, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.993 o más, la exactitud fue desde un 91 a un 105%. El límite de cuantificación fue de 100 ng/mL, obteniendo un método sensible para su aplicación en el monitoreo terapéutico de fármacos⁸⁹.

Más adelante, en el 2010, Baietto *et al.*, desarrollaron y validaron un método para la cuantificación simultánea de Daptomicina, Amikacina, Gentamicina y Rifampicina, por HPLC/MS en plasma humano. La preparación de la muestra se realizó mediante precipitación de proteínas con acetonitrilo. La separación por

cromatografía fue realizada a 35 °C, sobre una columna Sinergy Hidro RP, eluyendo con gradiente. Las condiciones en el detector de MS fueron: ESI, ionización positiva, a una temperatura de desolvatación de 350 °C. Se monitorearon las transiciones: m/z 1620-810.9; para Daptomicina, m/z 586.0-264.0; para Amikacina, m/z 477.7-322.0; para Gentamicina, m/z 822.0-823.0; para Rifampicina y m/z 312-313.0; para Quinoxaleína, usado como estándar interno. En la validación del método, obtuvieron una linealidad $r^2 = 0.998$. Los límites de cuantificación fueron 1.56, 2.34, 0.03, 0.63 µg/mL para Daptomicina, Amikacina, Gentamicina y Rifampicina, respectivamente. Se obtuvieron recuperaciones desde el 83.6% hasta el 92.1%. El método resultó específico, sensible y reproducible para estudios farmacocinéticos⁹⁰.

En el 2015, Grarin *et al.*, determinaron Amikacina en plasma humano mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección por fluorescencia, derivatizando la Amikacina con ortoftaldehído en presencia de N-acetil-L-cisteína a pH 9.5, durante 5 min a 80°C. La separación de los derivados se hizo en una columna C₁₈ de fase reversa, con una fase móvil de buffer fosfato 0.05 M: acetonitrilo (80:20, v/v). La detección se realizó a 337 y 439 nm para excitación y emisión, respectivamente. Se obtuvo un tiempo de retención de 9 min, una linealidad en el rango de concentración de 2 – 50 µg/mL, con un coeficiente de correlación arriba de 0.995, límite de detección 0.068 µg/mL. Se mostró un método aceptable, obteniéndose derivados de Amikacina estables durante varias horas a temperatura ambiente⁹¹.

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Justificación

En la actualidad en México, en el ambiente hospitalario, pocos medicamentos se estudian en niños y existe un número limitado de estudios poblacionales de farmacocinética y farmacodinamia. Los antibióticos son extensamente prescritos en neonatos, ya que las infecciones son frecuentes y están asociadas con un alto riesgo de morbilidad y mortalidad. Las bacterias Gram negativas son los agentes causales más frecuentes de infecciones sistémicas nosocomiales, donde los Aminoglucósidos fungen un papel importante debido al amplio espectro hacia estos microorganismos. La mayoría de los regímenes de dosificación no reflejan la farmacocinética pediátrica. Para lograr el objetivo terapéutico se deben considerar variables demográficas, fisiopatológicas y clínicas del paciente, ya que existe una gran diferencia interindividual con respecto a la disposición y eliminación de los fármacos en este grupo poblacional. Urge la necesidad de optimizar la prescripción de

antibióticos y desarrollar un consenso terapéutico basado en la evidencia a partir de los datos disponibles. Una vez seleccionado el objetivo terapéutico el paciente no debe exponerse a un mayor riesgo de toxicidad de lo que justifique la necesidad del fármaco, ni obtener menos del fármaco de lo que es mínimamente necesario para su efecto. Para fármacos como los Aminoglucósidos que muestran eficacia y toxicidad dependiente de la concentración y por sus propiedades fisicoquímicas, resulta muy ventajoso conocer las variables que afectan o contribuyen a una terapia adecuada y poder asegurar el bienestar del paciente. El uso inapropiado de éste tiene efectos perjudiciales como el desarrollo de patógenos resistentes y la incidencia de nefrotoxicidad y ototoxicidad, pudiendo prolongar la hospitalización, aumentando el riesgo de mortalidad. La evaluación de la utilización de estos fármacos puede mejorar y disminuir el fracaso del tratamiento. Debido a que los Aminoglucósidos tienen una actividad bactericida dependiente de la concentración, la correlación entre la dosis administrada y los niveles plasmáticos alcanzados nos dará una base esencial para evaluar su efectividad terapéutica y poder establecer lineamientos adecuados para su uso racional.

3.2 Hipótesis

La C_{\max} de Amikacina en la población de estudio corresponderá con el rango reportado en la literatura.

3.3 Objetivo General

Evaluar la efectividad terapéutica de Amikacina mediante su perfil de seguridad y toxicidad utilizando parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.

3.4 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas para la determinación de Amikacina en plasma humano.
- Validar el método analítico para la determinación del fármaco utilizando HPLC-MS/MS, según la normatividad nacional e internacional.
- Determinar la Concentración plasmática máxima del medicamento (C_{max}) en los grupos de estudio.
- Identificar los microorganismos contra los que se usa el medicamento en la población estudiada y obtener su CMI reportada.
- Determinar la efectividad terapéutica de Amikacina mediante parámetros farmacocinéticos, microbiológicos y clínicos.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1 Estrategia general

Etapa I. Validación del método analítico.

Etapa II. Selección de pacientes, obtención de muestras y revisión de expedientes clínicos.

Etapa III. Determinación de concentraciones de Amikacina y Evaluación de resultados.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Equipo

4.2.1.1 Instrumentos y herramientas.

- Agitador tipo Vortex marca Daigger, modelo Genie 2.
- Balanza analítica marca A&D, modelo GR200.

- SPE Vaccum Manifold AHU-6024, marca Phenomenex.
- Plancha de calentamiento con agitación marca Corning, modelo PC-420.
- Cromatógrafo de Líquidos marca Shimadzu, modelo Prominence, acoplado a Espectrómetro de Masas marca AB Sciex, modelo API 4000 QTrap.
- Pipeta repipeteadora, marca Eppendorf, modelo Repeater plus.
- Micropipeta semiautomática marca Eppendorf de 20-200 μL , con incremento de 0,2 μL .
- Micropipeta semiautomática marca Eppendorf de 100-1000 μL , con incremento de 1 μL .
- Micropipeta semiautomática marca Eppendorf de 10-100 μL , con incremento de 0,1 μL .
- Micropipeta semiautomática marca Eppendorf de 0.5-10 μL , con incremento de 0,2 μL .
- Ultracongelador marca Dometic, modelo UF 455G.
- Refrigerador.
- Centrífuga.
- pH metro.

4.2.2 Reactivos

- Acetonitrilo, grado HPLC/MS, marca J.T. Baker.
- Agua, grado HPLC, marca J.T. Baker.
- Metanol, grado HPLC marca J.T. Baker.
- Ácido Fórmico marca J.T. Baker, grado reactivo.
- Hidróxido de Amonio, 32- 35%, marca Fisher Scientific.
- Ácido Clorhídrico, 28-30% marca J.T. Baker grado reactivo.
- Sustancias de referencia descritas en TABLA 8.

TABLA 8. Sustancias de Referencia.

Nombre	Cantidad	Marca	Lote	Pureza
Amikacina	300 mg	Sigma Aldrich, USP reference	R015HO	0.993 mg de Amikacina por mg de material sobre su base anhidra.
Sulfato de Kanamicina B	100 mg	Sigma Aldrich	094M4777V	Libre de base

4.2.3 Materiales

- Matraces volumétricos de 10, 25 y 50 mL clase A, marca Pyrex.
- Matraz bola de 500 mL, marca Pyrex.
- Puntas para pipeta repipeteadora de 1 y 10 mL.

- Puntillas para micropipetas semiautomáticas de 100-1000µL, 20-200 µL, 10-100 µL y 0.5-10 µL.
- Tubos de polipropileno de 15 y 50 µL.
- Tubos de vidrio sin labio, de 13 x 100.
- Tubos vacutainer con EDTA, de 5 mL.
- Vasos de precipitado de vidrio de 250 mL.
- Viales de vidrio con tapa e inserto, de 1 mL.
- Cartuchos Strata X-C, intercambio catiónico y fase reversa, sorbente 100 mg, 33 µm, 85 Å, marca Phenomenex.
- Papel filtro Whatman No. 1 y 4.
- Agitadores magnéticos de barra.
- Probeta de vidrio graduada de 100 mL, marca Pyrex.
- Microtubos con capacidad de 1.5 mL, marca Eppendorf.
- Espátula.
- Gradilla para tubos de 1.5 mL.
- Guantes.
- Gasas de algodón de 10 x 10 cm, un solo uso.

4.2.4 Métodos (Etapa I)

El método analítico se desarrolló en el Laboratorio de Química Forense del Instituto de Criminalística y Servicios Periciales de la Fiscalía General de Justicia de Nuevo León.

4.2.4.1 Preparación de disoluciones estándar, disoluciones de trabajo, reactivos y controles.

4.2.4.1.1 Cálculos para la preparación de disoluciones. Los cálculos para la determinación de la concentración de una disolución a partir de un estándar se basan en la fórmula general: $C_1V_1 = C_2V_2$.

Los cálculos para la determinación de Normalidad se basan en la fórmula general: $N = \text{No. de equivalentes en gramos de soluto} / \text{Litros de solución}$.

4.2.4.1.2 Preparación de una serie de disoluciones de trabajo de Amikacina a partir de la solución stock de 1 mg/mL.

TABLA 9. Diluciones seriadas a partir de una solución stock de Amikacina de 1 mg/mL.

	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4
Volumen	0.1 mL de sol. stock	1 mL de sol. 1	1 mL de sol. 2	0.5 mL de sol. 2
Llevar a volumen con agua/metanol, 30/70, v/v	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Conc. Final (µg/mL)	10	1	0.1	0.05

Todas las soluciones se llevaron a vortex por 1 minuto.

4.2.4.1.3 Preparación de una serie de disoluciones de trabajo de Kanamicina B a partir de la disolución stock de 200 µg/mL.

TABLA 10. Diluciones seriadas a partir de una disolución stock de Kanamicina B de 200µg/mL.

	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4
Volumen	1 mL de sol. stock	1 mL de sol. 1	1 mL de sol. 2	0.5 mL de sol. 2
Llevar a volumen con agua/metanol, 70/30, v/v	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Conc. Final (µg/mL)	20	2	0.2	0.1

4.2.4.1.4 Para la preparación de la curva de calibración en disolución y en matriz, ver TABLAS 11, 12,13 y 14.

TABLA 11. Preparación de disoluciones de trabajo a partir de la disolución Stock de Amikacina 2 mg/mL.

Soluciones de Trabajo	Conc. µg/mL	µL de disolución Stock de Amikacina 2 mg/mL	Llevar a volumen con metanol/agua, 70/30, v/v
ST_CC1	20	100	10 MI
ST_CC2	40	200	10 mL
ST_CC3	80	400	10 mL
ST_CC4	120	600	10 mL
ST_CC5	140	700	10 mL
ST_CC6	160	800	10 mL
ST_CC7	200	1000	10 mL
ST_PC1	60	300	10 mL
ST_PC2	100	500	10 mL
ST_PC3	180	900	10 mL

TABLA 12. Preparación de disoluciones de trabajo Estándar Interno a partir de la disolución Stock de Kanamicina B 200 µg/mL.

Solución de trabajo	Concentración µg/mL	µL de solución stock de Kanamicina B 200 µg/mL	Llevar a volumen con metanol/agua, 30/70, v/v
ST_EI	20	1000	10 MI

TABLA 13. Preparación de curva de calibración en matriz (pool de plasma humano bajo resguardo en la PGJ)

Punto de la curva	Conc. µg/mL	Disolución de Trabajo 100 µL	Disolución de Trabajo EI 50 µL	Matriz µL (pool de plasma)	Volumen Final µL
CC1	2	ST_CC1	ST_EI	850	1000
CC2	4	ST_CC2	ST_EI	850	1000
CC3	8	ST_CC3	ST_EI	850	1000
CC4	12	ST_CC4	ST_EI	850	1000
CC5	14	ST_CC5	ST_EI	850	1000
CC6	16	ST_CC6	ST_EI	850	1000
CC7	20	ST_CC7	ST_EI	850	1000
PC1	6	ST_PC1	ST_EI	850	1000
PC2	10	ST_PC2	ST_EI	850	1000
PC3	18	ST_PC3	ST_EI	850	1000

TABLA 14. Preparación de curva de calibración en matriz.

Punto de la curva	Conc. µg/mL	Disolución de Trabajo 200 µL	Disolución de Trabajo EI 100 µL	Matriz µL (pool de plasma)	Volumen Final µL
CC1	2	ST_CC1	ST_EI	1700	2000
CC2	4	ST_CC2	ST_EI	1700	2000
CC3	8	ST_CC3	ST_EI	1700	2000
CC4	12	ST_CC4	ST_EI	1700	2000
CC5	14	ST_CC5	ST_EI	1700	2000
CC6	16	ST_CC6	ST_EI	1700	2000
CC7	20	ST_CC7	ST_EI	1700	2000
PC1	6	ST_PC1	ST_EI	1700	2000
PC2	10	ST_PC2	ST_EI	1700	2000
PC3	18	ST_PC3	ST_EI	1700	2000
MB	0	-	-	2000	2000
MC cero	0	-	ST_EI	1900	2000

4.2.4.2 Determinación de los parámetros de la fuente de iones, gas, voltaje y temperatura.

Se modificaron los parámetros CUR, CAD, IS, TEM, GS1, GS2, hasta alcanzar la mejor señal (alta y estable), para cada una de las distintas disoluciones de AMK/ KAN B a 1000 ng/mL (su preparación se describe en el punto h), anexo A) en solventes y/o mezclas de solventes a distintas proporciones de ácido fórmico (disoluciones propuestas como fase móvil, se disolvieron en cada F.M. A y F.M. B).

4.2.4.3 Determinación de Amikacina en el espectrómetro de MS/MS.

Se probaron distintas mezclas en disolución de Amikacina a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 ng/mL) así como distintas proporciones de metanol/agua, y a diferentes porcentajes de ácido fórmico, con inyección

directa continua al espectrómetro de masas, donde se observó la respuesta analítica de la molécula en disolución, hasta encontrar la cual nos diera información referente al patrón de fragmentación característico de la molécula. (ver TABLA 15).

TABLA 15. Mezclas probadas para la determinación de Amikacina en el Espectrómetro de Masas.

Disolución stock de Amikacina 1 mg/mL a distintas proporciones de metanol/agua, v/v	Diluciones a partir de la disolución stock de Amikacina (1mg/mL)		
	Concentración de Amikacina	metanol/ agua (v/v)	ácido fórmico (%)
50/50	100 ng/mL	50/50 30/70 70/30	0.01
30/70	200 ng/mL		0.05
70/30	500 ng/mL		0.1
50/50, al 0.05 % de ácido fórmico	1000 ng/mL		sin ácido fórmico

Se preparó una disolución stock de Amikacina a una concentración de 1 mg/mL, en metanol/agua, 70:30, v/v (condición a la cual se obtuvo mejor respuesta). De esta disolución stock se prepararon una serie de diluciones a distintas concentraciones (10 000, 1000, 100 y 50 ng/mL), las cuales se analizaron en el MS mediante inyección directa continua, donde a una concentración de 1000 ng/mL, se identificó el ion molecular, así como los iones de mayor abundancia y estabilidad característicos a la fragmentación de la molécula (ver Figura 6) y se establecieron las mejores condiciones espectrométricas para ello.

4.2.4.4 Determinación de Kanamicina B en el espectrómetro de MS/MS.

Se llevaron a cabo una serie de pruebas para la disolución Kanamicina B, a distintas proporciones de metanol y agua, así como de ácido fórmico (ver TABLA 16).

TABLA 16. Mezclas probadas para la disolución de Kanamicina B

Concentración de Kanamicina B	metanol/agua, v/v	Ácido fórmico (%)
200 µg/mL	70/30	0.01
	50/50	0.05
	30/70	0.1
	100 % agua	sin ácido fórmico

Se preparó una disolución stock de Kanamicina B a una concentración de 200 µg/mL, en metanol/ agua, 30/70, v/v (condiciones de mejor disolución). A partir de la disolución stock, se prepararon una serie de diluciones a distintas concentraciones (20 000, 2 000, 200 y 100 ng/ mL), las cuales se analizaron en el MS mediante inyección directa continua, donde a una concentración de 2 000 ng/mL, se identificó el ion molecular, así como los iones de mayor abundancia y estabilidad característicos a la fragmentación de la molécula (ver Figura 7) y se establecieron las mejores condiciones espectrométricas para ello. Se obtuvo la mejor respuesta (señal más alta y estable) en Fase móvil A: agua al 0.2% de ácido fórmico, Fase móvil B: ACN al 0.2% de ácido fórmico, de donde se tomaron los parámetros de la optimización como condiciones espectrométricas (ver TABLA 21), para trabajar posteriormente con el sistema cromatográfico.

4.2.4.5 Condiciones cromatográficas.

En la TABLA 17 se resumen las condiciones cromatográficas que fueron probadas con una solución de AMK/ KAN B a 1000 ng/mL durante el desarrollo del método hasta obtener las mejores condiciones para las moléculas.

TABLA 17. Condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo del método.

Fase Estacionaria	Fase móvil	Flujo, $\mu\text{L}/\text{min}$	% de F.M B	T ° en la columna
Columna Luna NH ₂ , 3 μm , 100 A, 50 x 4.6 mm.	800, 1,000	800, 1000	10	40 °C

El sistema cromatográfico seleccionado fue: Columna Luna NH₂, 3 μm , 100 A, 50 x 4.6 mm, F.M. A: agua al 0.2% de ácido fórmico, F.M. B: ACN al 0.2% de ácido fórmico, flujo de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$, temperatura en la columna 40 °C, elución isocrática, 10 % de F.M. B, ya que se obtuvieron más cuentas por segundo (cps) para cada molécula, picos más definidos.

4.2.4.6 Preparación de la curva de calibración.

La curva de calibración se construyó a 7 niveles de concentración (de 2 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como se describe en la TABLA 14), con tres series de puntos control, dentro del mismo rango de la curva, pero distintos a los puntos de la curva de calibración. El rango de concentración fue seleccionado de acuerdo a los niveles plasmáticos de AMK esperados en la población de estudio (ver TABLA 6).

4.2.4.7 Tratamiento de muestra.

Se trabajó con un pool de plasma humano (resguardo confidencial de la PGJ), el cual se filtró previamente con papel filtro Whatman #1, se conservó a -80 °C hasta su utilización. Se trabajó con las curvas de calibración descritas en las TABLAS 13 y 14, así como con el sistema Cromatográfico y de Espectrometría de masas descritos en las TABLAS 20 y 21.

4.2.4.7.1 Precipitación de proteínas. Se realizó un enriquecimiento de plasma de AMK/KAN B a una concentración final de 1000 ng/mL, para 12 cargas de 1 mL. A 900 µL de plasma se añadieron 50 µL de ST_CC1 y ST_EI, respectivamente, se llevaron a vortex por 30 s, de ahí se tomaron 400 µL del plasma enriquecido y se añadieron 400 µL de ACN, Metanol, ACN: Metanol, 1:1, cada uno por triplicado en tubos eppendorf, se llevaron a vortex durante 1 min, enseguida se llevaron a centrifugación 3 min, a 13,500 rpm, a 8 °C. Se transfirió el sobrenadante a un vial para Cromatografía y se llevó a su análisis para HPLC-MS/MS. Se realizó precipitación de proteínas de la misma manera para 12 cargas de 1 mL de plasma enriquecidas de AMK/KAN B a una concentración final de 10,000 ng/mL. A 850 µL de plasma enriquecido se añadieron 100 µL de disolución de trabajo de 100 µg/mL de AMK y 50 µL de disolución stock de KAN B.

Se obtuvieron mejores recuperaciones para ambas moléculas en la precipitación de proteínas con ACN, por lo que se continuó probando otros sistemas.

Se enriquecieron 12 cargas de plasma colocando para cada una 900 μL de plasma filtrado en tubos eppendorf, se añadieron a cada uno 100 μL de ST_CC7, se mezclaron en vortex durante 30 s. Se tomaron 400 μL del plasma enriquecido, se añadieron 400 μL de ACN y 50 μL de ST_EI, se llevaron a agitación en vortex durante 1 min. La mezcla se llevó a centrifugación 3 min, 8 °C, 13,500 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio y se llevó a sequedad en una atmósfera de nitrógeno a 20 psi, 15 min a 50 °C, en un baño con agua. Se reconstituyeron con 100 μL de las siguientes disoluciones, cada una por triplicado:

- ACN al 0.2% de ácido fórmico
- Agua al 0.2% de ácido fórmico
- ACN
- Agua

4.2.4.7.2 Extracción en Fase Sólida (SPE). Se realizó con cartuchos de intercambio catiónico, utilizando una estación de vacío de 24 posiciones (Vaccum Manifold). Para la SPE se evaluaron las condiciones de acondicionamiento, equilibrio, carga de muestra, lavado y elución, donde se utilizó 5 mmHg de vacío. La SPE se llevó a cabo en la finalidad de depurar y eliminar posibles interferencias, así como compuestos endógenos presentes en la matriz.

4.2.4.7.2.1 Disolvente de elución. Para establecer el disolvente de elución se probaron distintos sistemas por duplicado como se muestra en la TABLA 18. Se seleccionó el disolvente con el cual se obtuvieron recuperaciones de las

moléculas, enseguida se modificó el pH del disolvente de elución y se analizaron las fracciones de lavado, donde se observaron ambas moléculas, debido a ello se probaron distintos sistemas donde se modificó la composición y pH de las disoluciones de lavado.

TABLA 18. Sistemas probados para la elección del disolvente de elución.

Acondicionamiento	1 mL de metanol			
Equilibrio	1 mL de agua			
Carga de muestra	1 mL, para CC1 y CC7 de la curva de calibración.			
Lavado	1 mL de HCl 0.1 N en agua			
Lavado	1 mL de HCl 0.1 N en metanol			
Elución	2x 500 μ L de hidróxido de amonio al 5% en Acetonitrilo	2x 500 μ L de hidróxido de amonio al 5% en metanol	2x 500 μ L de hidróxido de amonio al 5% en agua	2x 500 μ L de hidróxido de amonio al 10% en agua

4.2.4.7.2.2 Disoluciones de lavado. De acuerdo a los resultados obtenidos, se cambió la composición de las disoluciones de lavado, el volumen de carga de muestra y se trabajó con el disolvente de elución, con el cual se obtuvieron mejores recuperaciones, el cual fue hidróxido de amonio al 10% en agua, ver TABLA 19.

TABLA 19. Sistemas probados para la elección de la composición de las disoluciones de lavado.

Acondicionamiento	1 mL de metanol	
Equilibrio	1 mL de agua	
Carga de muestra	1 mL, para CC1 y CC7 de la curva de calibración.	2 mL, para CC1 y CC7 de la curva de calibración.
Lavado	1 mL de agua	1 mL de HCl 0.01 N
Lavado	1 mL de metanol	1 mL de HCl 0.01 N
Elución	2x 500 μ L de hidróxido de amonio al 10% en agua	

4.2.4.7.2.3 Volumen de carga de muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos con las pruebas anteriores, se continuó con la evaluación modificando el volumen de carga a 2 mL con el cual se obtuvo mejor respuesta, así como con las disoluciones de lavado con 1 mL de agua y metanol, respectivamente. Se probaron a distintos porcentajes hidróxido de amonio como disolución de elución a 5, 12 y 15% en agua.

4.2.4.7.2.4 Disolución de equilibrio. Se cambió la composición y el volumen de la disolución de equilibrio, se trabajó con 2 mL de metanol para acondicionamiento, 2 mL de agua pH 2.5, 2mL de carga de muestra, 1 mL de agua y metanol, como disoluciones de lavado e hidróxido de amonio al 5%, como disolución de elución.

Con las mejores condiciones obtenidas se realizó una curva de calibración en matriz por duplicado (ver TABLA 14).

4.2.4.8 Desarrollo del método analítico.

Se prepararon 2 mL de matriz enriquecida (ver TABLA 14) en tubos de polipropileno de 15 mL. Se agitaron en vortex a máxima velocidad por 30 s para homogenizar. Para SPE en cartuchos STRATA-X-C, se colocaron los cartuchos en SPE Vacuum Manifold. Enseguida se acondicionaron con 2 mL de metanol, después se activaron con 2 mL de agua HPLC acidificada, pH 5, se leyeron las muestras enriquecidas previamente, posterior a esto, se lavaron con 1 mL de agua HPLC, seguido por 1 mL de metanol. Se eluyó dos veces con 500 μ L de hidróxido de amonio en agua, pH 11.73. Se transfirió cada fracción eluida a un vial de vidrio con tapa de 1 mL, se taparon y analizaron siguiendo el Instructivo para el manejo de Cromatógrafos de Líquidos acoplados a Espectrómetros de Masas/Masas.

Previo al análisis de muestras, se verificó el sistema Cromatográfico de Líquidos acoplado a Espectrómetro de Masas/Masas. Las condiciones de HPLC-MS/MS para el análisis de AMK/KAN B se muestran en las TABLAS 20 y 21.

TABLA 20. Condiciones cromatográficas para la determinación de AMK/KAN B.

Columna	Luna NH ₃ , 3 μ m, 100 Å, 50 X 4.6 mm
Fase móvil A	Agua al 0.2% de ácido fórmico
Fase móvil B	ACN al 0.2% de ácido fórmico
Volumen de inyección	5 μ L

Temperatura en la columna	40 °C
Flujo	800 µL/min
Elución	Isocrática, 10 % de F.M. B

TABLA 21. Condiciones Espectrométricas para el análisis de AMK/KAN B.

Parámetro	Valor
Modo de ionización	Positiva
Tipo de escaneo	Monitoreo de reacción múltiple (MRM)
Tipo de Ionización	Electrospray ESI+
Declustering Potential (DP)	Amikacina 70 V Kanamicina B 80 V
Entrance Potential (EP)	Amikacina y Kanamicina B 10 V
Collision Energy (CE)	Amikacina 35 V Kanamicina B 30 V
Collision cell exit potential (CXP)	Amikacina y Kanamicina B 10 V
Curtin gas (CUR)	10 psi
CAD gas	High
Temperatura	500 °C
IS Voltaje	5,500 V
GS₁/nebulizer	30 L/min
GS₂/Turbo gas	60 L/min

4.2.4.9 Validación del método analítico.

Los parámetros de validación/verificación del método analítico se establecieron de acuerdo a normas nacionales e internacionales^{92, 93, 94, 95, 96}.

4.2.4.9.1 Fórmulas utilizadas para los cálculos en la validación.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

$$DE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$\%CV = \frac{DE}{\bar{X}} * 100 \quad (3)$$

4.2.4.9.2 Selectividad, Interferencia, Efecto de matriz. Se procesaron 3 unidades de matriz biológica normal, lipémica, hemolizada e icterica. El proceso se realizó con Matriz Blanco (MB). Se procesó la misma matriz biológica. El proceso se realizó con una matriz enriquecida de la misma forma que PC1 y PC3 (ver TABLA 14). Se obtuvo para cada unidad un Factor Matriz Normalizado por el Estándar Interno, conforme a la Fórmula 4.

$$FMN = \frac{\frac{Ram}{Reim}}{\frac{Ras}{Reis}} \quad (4)$$

Selectividad: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20 % para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el Estándar Interno. La matriz blanco no debe presentar aumento o supresión de la señal en el tiempo de retención del analito de interés. Interferencia y Efecto de Matriz: El CV % del FMN calculado de las 6

unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15 %. Las matrices evaluadas no deben afectar el resultado del análisis dando falsos positivos.

4.2.4.9.3 Linealidad. Se analizó el rango propuesto para la curva de calibración (ver TABLA 14). Se procesaron 5 curvas de calibración con 2 series de puntos control PC 1, PC 2 y PC 3 (diferentes a los de la curva de calibración y estaban incluidos en el intervalo de trabajo), MB y Mcero distribuidas en 3 días consecutivos (3 curvas en un día y 1 curva por día restante) en la matriz en el rango propuesto durante el desarrollo del método. Criterio de aceptación: Las curvas de calibración deben ajustarse a un modelo $y=mx + b$ y deben tener un coeficiente de correlación (r) ≥ 0.995 . Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20 %. Al menos el 75 % de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio. Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20 % para el límite inferior de cuantificación. Si la curva de calibración cuenta con más de seis puntos, se puede eliminar o no tomar en cuenta aquellos que no cumplan con el criterio de aceptación de porcentaje de recuperación, siempre y cuando no sean los puntos extremos.

4.2.4.9.4 Límite de cuantificación. El punto más bajo de la curva de calibración se determinó en base al 5% del C_{\max} reportado para la Amikacina. Se analizaron una serie de diluciones por triplicado, a partir de CC1 de la curva

de calibración (1:2, 1:3, 1:6) y se determinó la relación señal ruido (S/R). Criterios de aceptación: La relación señal/ruido debe ser al menos de 10:1 y el coeficiente de variación debe ser menor al 15%.

4.2.4.9.5 Límite de detección. Se analizaron una serie de diluciones por triplicado a partir del CC1 de la curva de calibración (1:2, 1:4, 1:8, 1:10) y determinó la relación señal ruido (S/R). Se calcula en base a la siguiente fórmula:

$Y_{LD} = Y_B + 3\sigma_B$, donde Y_B es la respuesta de la media de 10 blancos analíticos y σ_B es la desviación estándar.

Criterios de aceptación: La relación señal/ruido debe ser al menos de 3:1 y el coeficiente de variación debe ser menor al 15%.

4.2.4.9.6 Prueba de acarreo. Se analizó un blanco después de la disolución de mayor concentración de la curva de calibración. Esta prueba se realizó por triplicado y se tomó de la prueba de linealidad, analizando en todas las curvas de calibración un mínimo de 3 inyecciones del mismo blanco después del punto de la curva de mayor concentración. Criterio de aceptación: La señal (área) observada debe ser $\leq 10\%$ del área del límite de cuantificación del analito de interés y 5% para el Estándar Interno.

4.2.4.9.7 Precisión. Se evaluó mediante:
Repetibilidad. Se realizó el análisis de tres disoluciones, PC1, PC2 y PC3 por triplicado en un día. Se calculó la concentración para cada nivel.

Reproducibilidad: Se realizó el análisis de tres disoluciones, PC1, PC2 y PC3, por duplicado durante tres días consecutivos.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación promedio debe ser menor al 15%.

4.2.4.9.8 Incertidumbre. Se calculó la desviación estándar de los datos obtenidos a partir del ejercicio de linealidad en cada uno de los puntos de la curva de calibración, de determina la incertidumbre expandida multiplicando la desviación estándar por 2. Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor al 15%.

4.2.4.9.9 Robustez. Se realizó con una serie de PC1, PC2 y PC3, se sometieron a condiciones extremas y ajenas a procedimiento (congelando y descongelando el extracto y se dejó el extracto a temperatura ambiente por dos horas). Criterio de aceptación: el porcentaje de recuperación debe ser $\pm 15\%$.

4.2.4.9.10 Estabilidad de la muestra. Se evaluó por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de los PC1 y PC3, se analizó inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones de ensayo a evaluar. Se interpolaron los puntos control en una curva de calibración recién preparada y se compararon las concentraciones obtenidas con la concentración nominal.

Estabilidad a corto plazo. Evaluar la estabilidad del analito en la matriz biológica a la temperatura ambiente y tiempo de procesamiento de la muestra (3 h).

Estabilidad a largo plazo. Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantienen las muestras (-70 °C, una semana), periodo de tiempo equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

4.2.5 Métodos (Etapa II)

4.2.5.1 Diseño de Estudio.

Prospectivo Observacional.

4.2.5.2 Lugar de Estudio.

Unidad de Cuidados Intensivos Postquirúrgicos de Pediatría, de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Cardiología No. 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

4.2.5.3 Población de Estudio.

TABLA 22. Clasificación de la población de estudio.

Neonatal	R/N hasta 28 días
Lactante menor	28 días hasta 11 meses
Lactante mayor	1 año hasta 1 año, 11 meses
Preescolar	2 años hasta 5 años 11 meses

4.2.5.4 Criterios de selección de la muestra.

4.2.5.4.1 Criterios de inclusión. Pacientes en terapia con Amikacina con un régimen de administración parenteral por más de dos dosis, para garantizar

obtener la C_{max} . Carta de consentimiento informado firmada previamente por el tutor del menor (ver ANEXO B).

4.2.5.4.2 Criterios de exclusión. Pacientes con daño hepático, debido a que no existe algún procedimiento para ajustar la dosis en daño hepático para este grupo poblacional.

4.2.5.5 Tamaño de la muestra.

Dadas las características del estudio, se tomarán todos los elementos del mismo que cumplan con los criterios de inclusión, que se limita a los pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos de Pediatría, de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Cardiología No. 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

4.2.5.6 Definición de variables.

Las variables que serán sujeto de estudio son definidas en el ANEXO C.

4.2.5.7 Descripción general del estudio.

Se revisó el expediente clínico de cada paciente que tenía terapia antimicrobiana con Amikacina, ya sea en monoterapia o terapia combinada, por más de dos dosis. Fueron seleccionados los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, enseguida se hizo el registro en formatos (ver ANEXO D), donde se recabó toda la información de interés. Se observaron durante la terapia distintos parámetros clínicos que se incluyeron en el análisis. Para cada paciente se obtuvo una muestra de sangre de catéter central, en un tubo vacutainer que contenía anticoagulante EDTA para la cuantificación del

Aminoglucósido en plasma (C_{\max}), mediante el método descrito en el punto 4.2.4.8. La toma se hizo a los 60 min de haber comenzado la infusión de la segunda dosis de Aminoglucósido, cuando la administración fue cada 24 h. Cuando la administración fue cada 12 h, se hizo a los 60 min de haber comenzado a la tercera dosis. Se consideró como respuesta adecuada al tratamiento a aquellos pacientes que se encontraron dentro del consenso de la guía de referencia rápida del Consejo de Salubridad General: Diagnóstico y tratamiento de Sepsis y Choque Séptico en pacientes de 1 mes a 18 años de edad.

4.2.5.8 Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados utilizando estadística descriptiva con medidas de tendencia central, donde las variables continuas fueron presentadas como media y desviación estándar. Las variables nominales se reportaron como porcentaje.

4.2.5.9 Aspectos éticos.

El presente estudio para efectos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, en el artículo 17, se clasifica como Investigación con riesgo mínimo, ya que es un estudio que emplea el riesgo de datos a través de procedimientos comunes como extracción de sangre (menor al 2% de sangre total en neonatos) y no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participaron en el estudio, que se limita a la población pediátrica

de la Unidad de Cuidados Intensivos Postquirúrgicos de Pediatría, que cumplieron con los criterios de inclusión.

Dado a que en el estudio participaron pacientes menores de 16 años, de acuerdo con el Artículo 36 del Reglamento de la Ley General de Salud, se incluyó una carta de consentimiento informado, en la cual el representante legal del menor autorizó su participación en pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, con capacidad de libre elección sin coacción alguna.

La obtención del consentimiento informado se hizo en el momento en el cual fue identificado el potencial participante, que cumplió con los criterios de inclusión descritos en el presente estudio. El representante legal del menor recibió una explicación clara y completa de tal forma que pudo comprender todos los aspectos de la investigación, esto se hizo por parte de los investigadores.

Los procedimientos de este estudio se apegan a normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud y a la Declaración de Helsinki vigente.

Procedimiento que se hizo para garantizar la confidencialidad de la información: se otorgó un folio a cada paciente, el cual se utilizó para identificar la hoja de datos del paciente.

Las posibles contribuciones y beneficios del estudio para los participantes son: Obtener la concentración eficaz del fármaco relacionada con la mejoría clínica del paciente, evitando y/o disminuyendo la posible aparición de efectos adversos.

Las posibles contribuciones y beneficios del estudio para la sociedad son: Optimizar la dosis de Amikacina para los microorganismos sensibles y evitar resistencia bacteriana.

La intervención o procedimiento representó para el menor una experiencia razonable y comparable con aquellas inherentes a su actual o esperada situación médica, teniendo altas posibilidades de obtener conocimientos generalizados sobre su condición o enfermedad, que son de gran importancia para comprender el trastorno o para lograr su mejoría en otros sujetos.

4.2.5.10 Bioseguridad.

Para el presente estudio, la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Cardiología No. 34 del IMSS, la Fiscalía General de Justicia de Nuevo León y sus colaboradores conocen y cumplen con lo siguiente:

- a)** La Ley General de Salud 2012. Título Quinto. Investigación para la Salud. Artículo 96-103.
- b)** El reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud.

- c) El Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud.
- d) Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos. Capítulo I a XII y transitorios.
- e) El Manual de Procedimientos para el Manejo y Control de Residuos Biológico infecciosos y Tóxico peligrosos en Unidades de Atención médica del IMSS.
- f) La NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, el proceso de identificación y clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- g) Las muestras biológicas se transportaron de acuerdo a las recomendaciones nacionales e internacionales.

4.2.5 Métodos (Etapa III)

4.2.6.1 Determinación de concentración de Amikacina.

Con el método analítico validado previamente se analizaron las muestras obtenidas de cada paciente. El plasma se descongeló a temperatura ambiente, y enseguida se analizó de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 4.2.4.8, para determinar la C_{\max} de Amikacina en cada paciente.

4.2.6.2 Recolección de datos microbiológicos.

Para cada paciente se obtuvieron los resultados microbiológicos del cultivo, realizado previamente por el área clínica del hospital, mediante la revisión de expedientes clínicos.

4.2.6.3 Evaluación de resultados.

De acuerdo a los resultados, se evaluó la razón entre la concentración plasmática máxima obtenida y la concentración mínima inhibitoria para los microorganismos detectados previamente para cada paciente, obteniendo los datos de la CMI de cada especie, de las referencias internacionales. Se evaluó si la C_{\max} de Amikacina en la población de estudio corresponde con el rango reportado en la literatura.

4.2.6.7 Análisis Estadístico.

Se ordenó y expresó la información de los pacientes utilizando estadística descriptiva. Nos apoyaremos con Excel y el paquete estadístico SPSS.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Amikacina es un Aminoglucósido para el tratamiento de infecciones hospitalarias severas causadas por bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos. Debido a su patrón de toxicidad y a su estrecha ventana terapéutica se requiere el desarrollo de métodos validados para su cuantificación en distintas matrices biológicas⁹⁷. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas es una técnica que ha permitido aumentar la sensibilidad de las técnicas cromatográficas. En este estudio se desarrolló y validó un método para la cuantificación de Amikacina en plasma humano, usando Kanamicina B como estándar interno, mediante HPLC-MS/MS.

5.1 Condiciones experimentales para la determinación de Amikacina en el espectrómetro de MS/MS

De la serie de diluciones de Amikacina probadas, se obtuvo una mejor respuesta a una concentración de 1000 ng/mL, en una mezcla de metanol/agua, 70/30, v/v, identificando el ion molecular, así como los iones de mayor abundancia y estabilidad característicos a la fragmentación de la molécula, obteniendo los siguientes resultados de la optimización (ver TABLA 23).

TABLA 23. Condiciones espectrométricas para el análisis de Amikacina.

Parámetro		Valor
Modo de ionización		Positiva
Tipo de escaneo		Monitoreo de reacción múltiple (MRM)
Tipo de Ionización		Electrospray ESI+
Transiciones monitoreadas		
Ion molecular (m/z)		Fragmentos (m/z)
Amikacina	586.3	425.2, 264.3, 163
Kanamicina B	484.3	324.2, 205.1, 163.3
Declustering Potential (DP)		Amikacina 70 V Kanamicina B 80 V
Entrance Potential (EP)		Amikacina y Kanamicina B 10 V
Collision Energy (CE)		Amikacina 35 V Kanamicina B 30 V
Collision cell exit potential (CXP)		Amikacina y Kanamicina B 10 V
Curtin gas (CUR)		10 psi
Cad gas		High

Temperatura	500 °C
IS Voltaje	5,500 V
GS ₁ /nebulizer	30 L/min
GS ₂ /Turbo gas	60 L/min

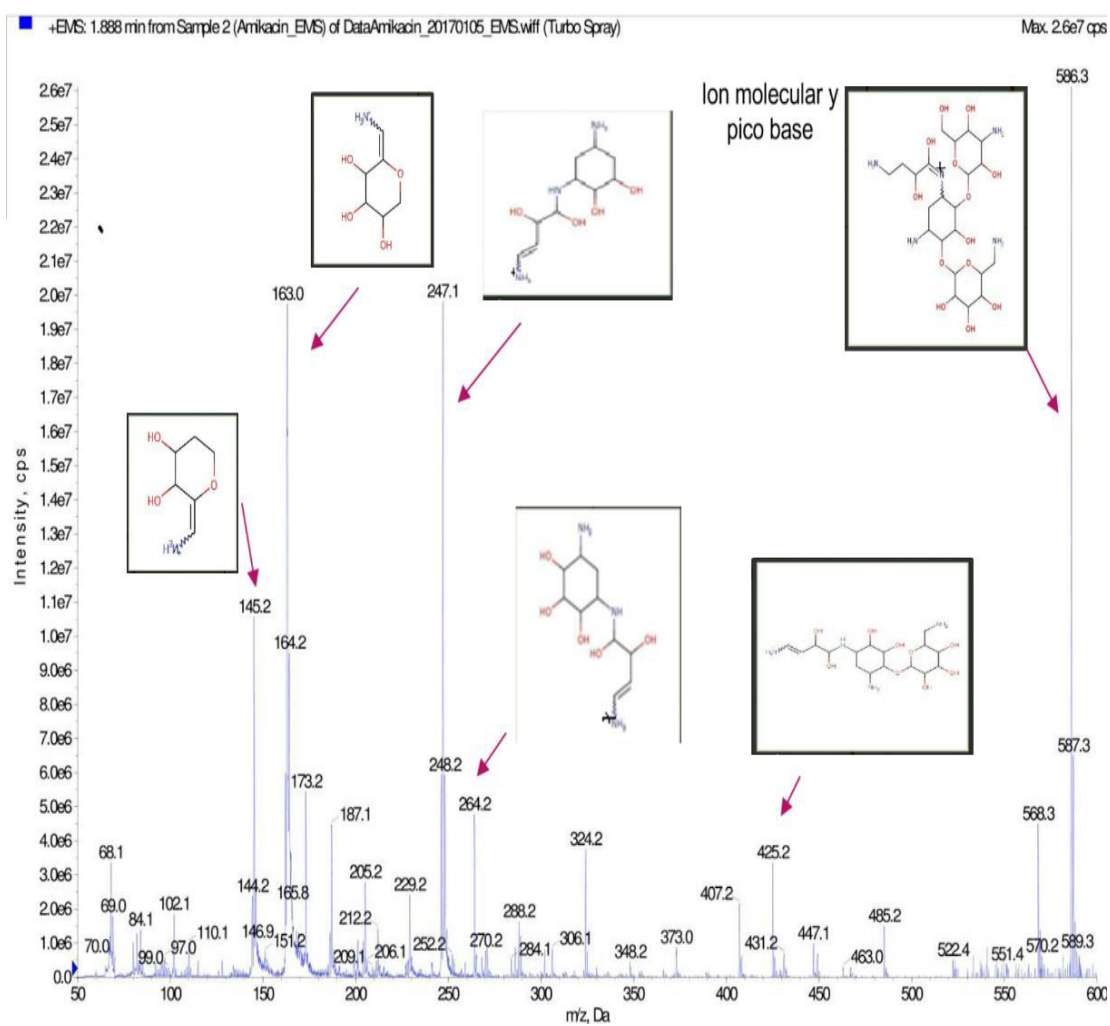


Figura 6. ESI MS/MS para $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$, $[M + H]^+$, m/z 586.3, EC 35 V, modo positivo.

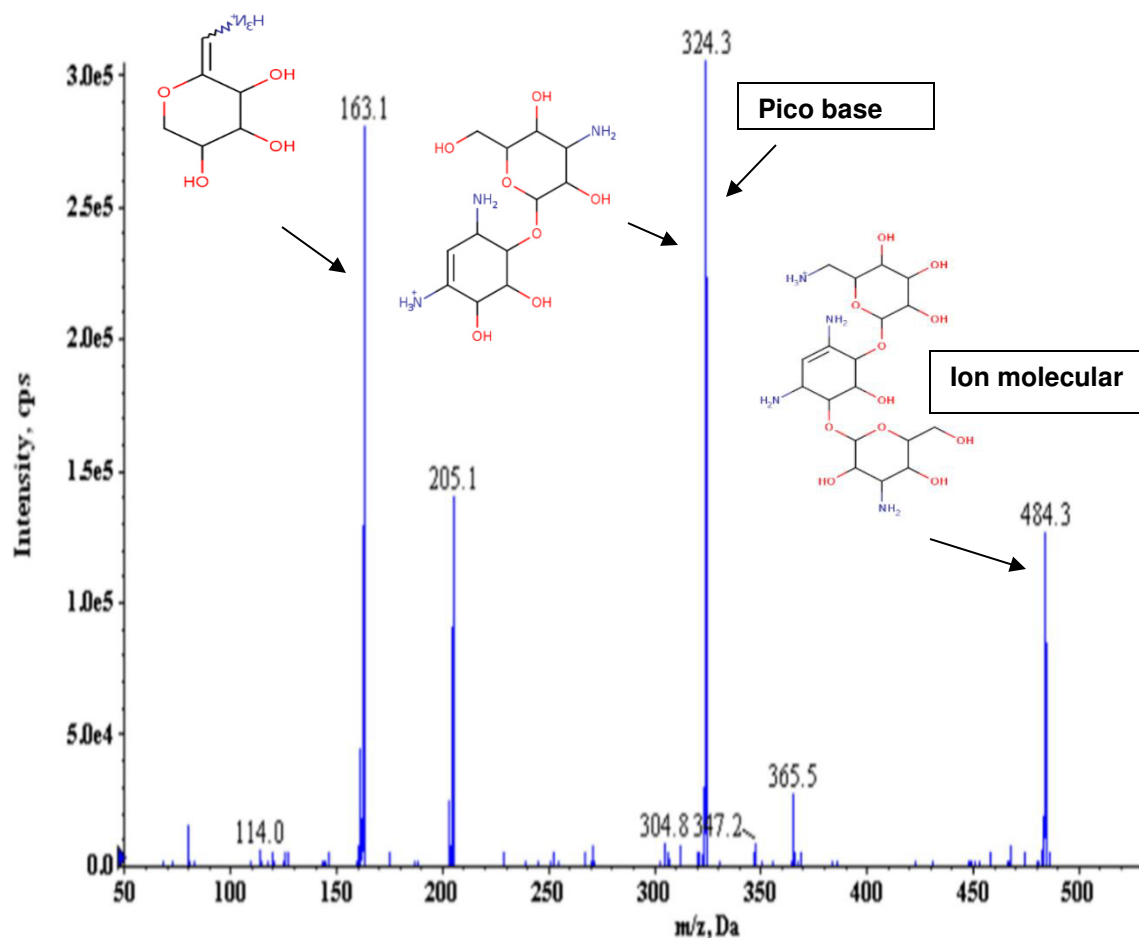


Figura 7. ESI MS/MS para $C_{18}H_{37}N_5O_{10}$, $[M + H]^+$, m/z 483.51, EC 30 V, modo positivo.

En el análisis de Amikacina y Kanamicina B mediante MS/MS, el espectro revela el pico base correspondiente a los iones moleculares, donde también se puede observar que los Aminoglucósidos muestran un patrón de fragmentación similar (ver Figuras 6 y 7). Distintos autores han reportado las transiciones monitoreadas durante el análisis de Amikacina por MS/MS, ver TABLA 24. Lo cual coincide con las transiciones monitoreadas en el presente estudio (m/z 586.3, 425.2, 264.3 y 163).

TABLA 24. Transiciones monitoreadas por distintos autores para Amikacina.

Año	Autores	Transiciones (m/z)	Energía de Colisión (V)
2007	Chi-Yu Lu, <i>et al.</i> ⁹⁸	586 425	20
2009	Lorena Baietto, <i>et al.</i>	586 264	30
2010	Perri A. Martos, <i>et al.</i>	586.4 425.2	29
2010	Perri A. Martos, <i>et al.</i>	586.4 163.1	55
2014	Yuma Bijleveld, <i>et al.</i> ⁹⁹	586.3 163.2	55

La optimización de las condiciones de MS nos permitió obtener los espectros correspondientes a cada molécula y así poder diferenciar analíticamente las mismas, ya que la MS se basa en la premisa de que existe un patrón de fragmentación característico para cada molécula de acuerdo a su relación m/z.

5.2 Sistema Cromatográfico

TABLA 25. Mejores condiciones Cromatográficas obtenidas.

Columna	Luna NH ₃ , 3 µm, 100 Å, 50 X 4.6 mm
Fase móvil A	Agua al 0.2% de ácido fórmico
Fase móvil B	ACN al 0.2% de ácido fórmico
Volumen de inyección	5 µL
Temperatura en la columna	40 °C
Flujo	800 µL/min
Elución	Isocrática, 10 % de F.M. B

Para la Cromatografía líquida, en el análisis de distintas soluciones propuestas como fase móvil, las moléculas exhiben una mejor respuesta a una mayor proporción de fase acuosa acidificada. La columna cromatográfica seleccionada tiene grupos amino unidos a la superficie de la sílice que sirven como intercambiadores de aniones débiles, teniendo selectividad polar en condiciones de fase reversa. La selección de la fase móvil es de mucha importancia en la HPLC-MS/MS, ya que la interfase de un EM evapora la fase móvil, por lo que se debe de evitar sales o buffers no volátiles que puedan ocasionar supresión iónica. Debido a la naturaleza polar de ambas moléculas y a la similitud en sus propiedades químicas, no fue posible la resolución de las mismas; tiempo de retención de Amikacina 0.50 min, Kanamicina B 0.49 min, ver Figura 8 y 9.

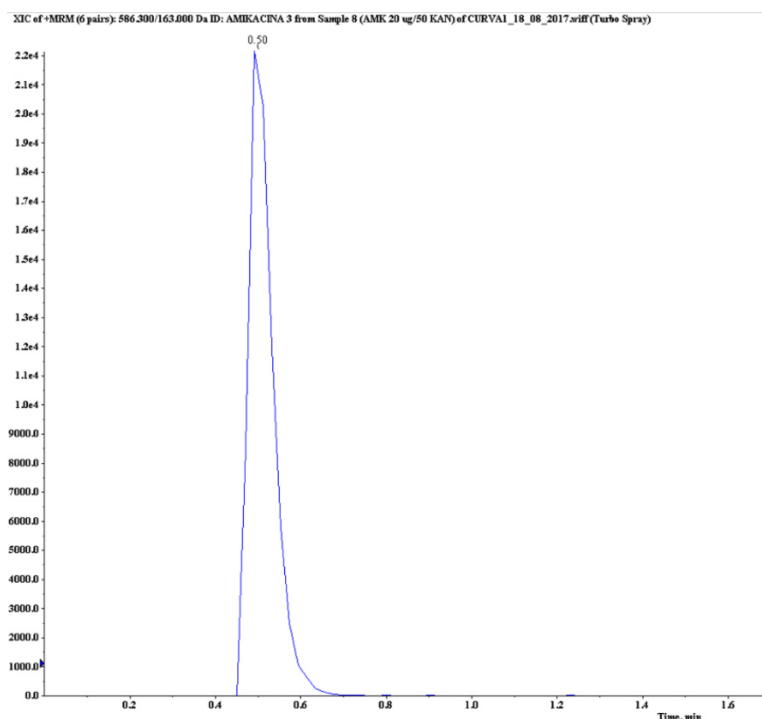


Figura 8. Cromatograma para Amikacina (14 µg/mL).

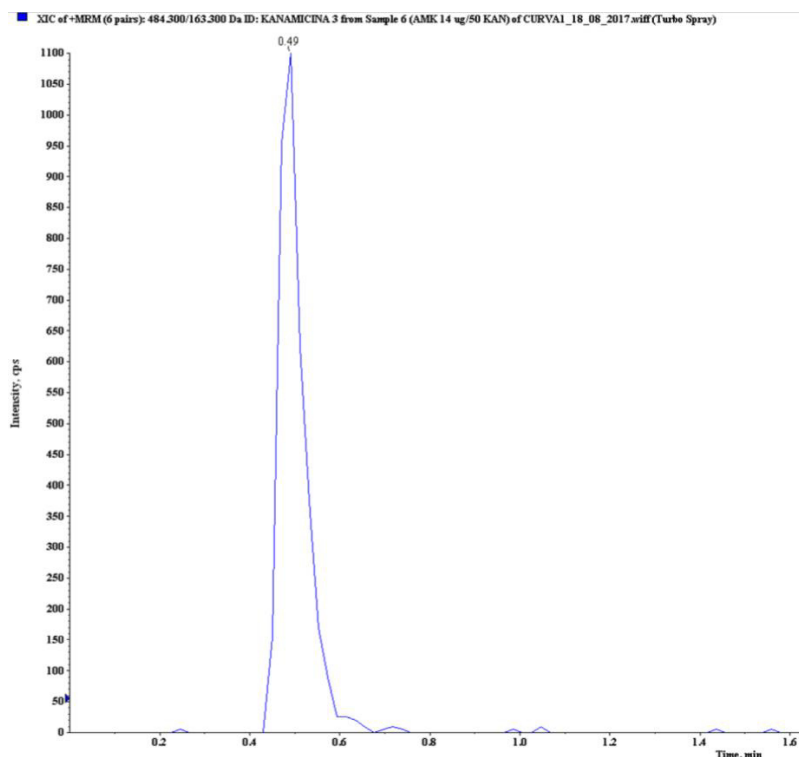


Figura 9. Cromatograma para Kanamicina B (EI).

5.3 Tratamiento de muestra.

La preparación de la muestra es usualmente el paso más laborioso, ya que aproximadamente el 60% del tiempo de un análisis, es empleado en la preparación de la muestra. La precipitación de proteínas se realiza mediante la adición de 2,3, o 4 partes de acetonitrilo u otro disolvente orgánico a una muestra. El disolvente orgánico reduce la constante dieléctrica de la solución de la muestra, aumentando la atracción entre las moléculas cargadas que promueve la agregación de las proteínas. Estas proteínas agrupadas se desprenden de la solución y son arrastradas al fondo de la muestra por centrifugación¹⁰⁰. Los sistemas probados con distintos solventes para la

precipitación, no arrojó que con acetonitrilo en una proporción de 1:1, se obtienen mejores recuperaciones de ambas moléculas, así como llevando a sequedad en una atmósfera de nitrógeno y reconstituyendo con agua. De acuerdo a las recuperaciones obtenidas mediante precipitación de proteínas con matriz enriquecida a distintas concentraciones de Amikacina y Kanamicina B, se continuó a probar SPE.

La SPE es una de las mejores técnicas para el aislamiento, purificación y concentración de los analitos. La SPE consiste en pasar una muestra diluida a través de un cartucho que contiene un relleno de un material que extrae selectivamente el analito de interés, desechando los compuestos que pueden producir interferencias en el análisis. La separación de ciertos componentes de una muestra se realiza mediante su distribución en dos fases: una estacionaria y otra móvil¹⁰¹. La SPE es importante cuando los compuestos van a ser cuantificados mediante un detector de Masas, ya que presentan una disminución significativa de interferencias por compuestos intrínsecos en las matrices complejas como el plasma humano¹⁰². En nuestro análisis por SPE se seleccionó el cartucho en función de las características de las moléculas, tomando en cuenta la solubilidad, polaridad, capacidad de ionización, ya que, de la selección del absorbente, dependerán los porcentajes de recuperación del analito. El cartucho seleccionado, Strata X-C, contiene un absorbente polimérico de intercambio catiónico sólido que acopla una cadena principal hidrófoba con un grupo funcional de ácido sulfónico. Este sorbente retiene a las AMK/KAN B mediante varios mecanismos: intercambio catiónico, uniones pi-pi

e interacciones hidrofóbicas. Para que se llevara a cabo la extracción de ambas moléculas fue necesario establecer las condiciones de acondicionamiento, equilibrio, carga de muestra, lavado y elución, ya que la retención de sustancias iónicas está regulada por el pH del medio. Las sustancias iónicas básicas como la AMK y KAN B pueden retenerse en columnas intercambiadoras de cationes, si se encuentran en su forma ionizada, es decir, el pH del medio es dos unidades menores que el valor del pKa de la base. La extracción se consigue incrementando el valor del pH de la disolución de elución por encima del pKa, aumentando así la fuerza iónica¹⁰³. Para el proceso de SPE para las moléculas se probaron distintas condiciones:

Activación de la columna: Se realiza con el objeto de solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna, es necesario para activar la superficie de la columna, así como también eliminar impurezas que pueden estar presentes en el dispositivo o que pueden estar recolectadas del ambiente del laboratorio durante el almacenamiento hasta su uso. Para nuestro método se seleccionó 2 mL de metanol.

Equilibrio: Se realiza con un disolvente igual o similar al empleado para disolución de las muestras. En este caso se utilizó agua acidificada (pH 2.5) con ácido clorhídrico (28-30%).

Carga de la muestra: En la aplicación de la muestra se recomiendan flujos lentos de para permitir la interacción de las moléculas con la fase estacionaria y así poder obtener buenas recuperaciones, si se usa vacío, se recomienda no

exceder a los 20 mmHg para evitar el secado de los cartuchos. Para nuestro método no se utilizó más de 5 mmHg.

Lavado de la columna: Se realiza para la eliminación de las impurezas retenidas en el paso anterior, utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no es extraído. Para el lavado utilizamos 1 mL de agua y metanol, respectivamente.

Elución: El solvente tiene que tener la fuerza iónica necesaria. Para AMK/KAN B, con un pKa de 9.7, se utilizó una disolución de hidróxido de amonio al 5%, a un pH de 11.73¹⁰⁴. Una vez desarrollado el método analítico se continuó con la validación del mismo para demostrar que es adecuado para el propósito previsto.

5.4 Validación del método analítico.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones previstas. Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados. Para el presente estudio se evaluaron las siguientes características de desempeño:

TABLA 26. Selectividad: Matriz enriquecida a 2 µg/mL de Amikacina, n=3.

	% Recuperación de Amikacina
Midazolam	109.9
Omeprazol	109.2
Acetaminofén	107.1
Ibuprofeno	115.9
Amiodarona	102.4
Metoclopramida	92.8

En el ensayo de Selectividad, se demuestra que la recuperación de Amikacina no se ve afectada por la presencia de los fármacos añadidos a una concentración conocida, que son utilizados de manera rutinaria como terapia concomitante en la población de estudio, ya que se recupera de un 92 hasta un 115.9% de Amikacina.

TABLA 27. Interferencias: Matriz enriquecida a 2 µg/mL de Amikacina, n=3.

Matriz	% Recuperación de Amikacina
Normal	95.0
Hemolizada	107.2
Lipémica	87.2
Ictérica	96.7

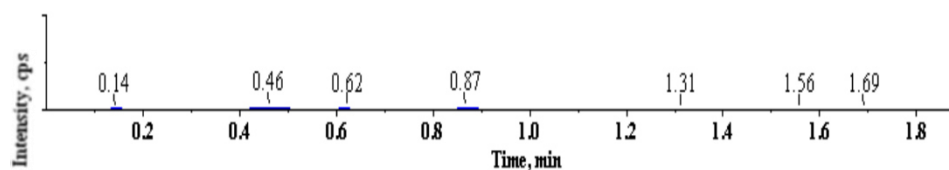


Figura 10. Cromatograma Blanco matriz hemolizada.

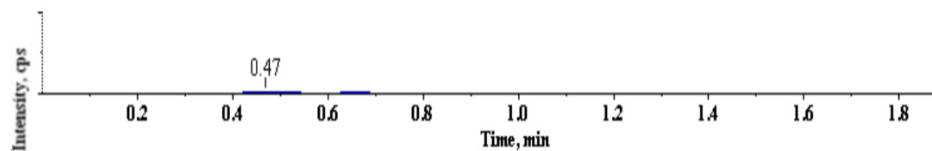


Figura 11. Cromatograma Blanco matriz normal.

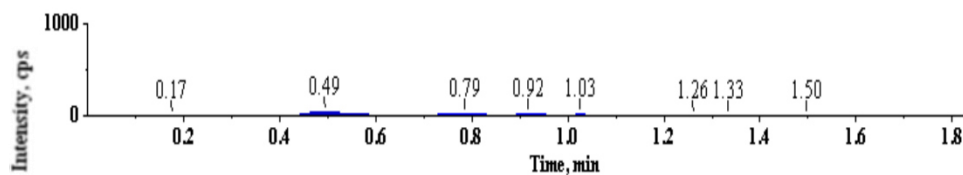


Figura 12. Cromatograma Blanco matriz lipémica.

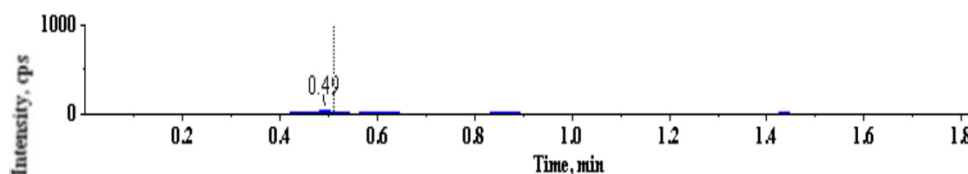


Figura 13. Cromatograma Blanco matriz ictérica.

En este ensayo se demuestra la no interferencia significativa de compuestos endógenos de la matriz biológica (normal, hemolizada, lipémica e ictérica), mediante la evaluación individual de al menos tres unidades de ésta, como se muestra en las imágenes 10, 11, 12 y 13, donde se puede observar que las matrices evaluadas no afectan el resultado dando falsos positivos. En la evaluación de estas matrices con la adición de Amikacina se obtienen porcentajes de recuperación del analito de interés del 87 al 107%, por lo que la matriz blanco no presenta aumento o supresión de la señal en el tiempo de retención del analito de interés, ni del estándar interno.

TABLA 28. Efecto Matriz: Matriz enriquecida a 2 µg/mL de Amikacina, n=3.

Matriz	Factor Matriz Normalizado (FMN), CV%
Normal	5.0
Hemolizada	2.8
Lipémica	12.8
Ictérica	3.3

El CV% del FMN calculado para cada muestra blanco matriz no es mayor al 15%, por lo que la respuesta analítica del analito y el estándar interno en matriz comparada en la solución nos indica que no hay una diferencia significativa.

TABLA 29. Límite de cuantificación, n=3.

Relación señal/ruido	CV%	Límite de cuantificación
10.9	4	0.3 µg/mL

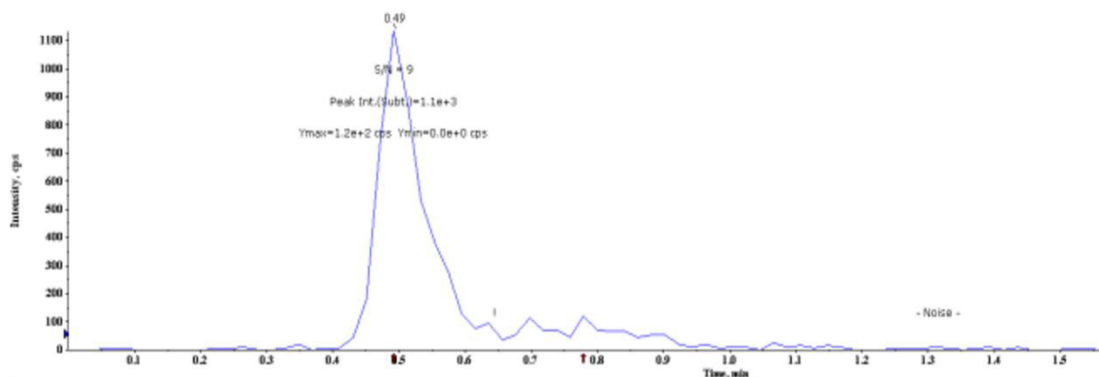


Figura 14. Cromatograma para Amikacina (0.3 µg/mL), relación S/R= 9.

Bajo condiciones experimentales se cuantificó con exactitud y precisión aceptables, un nivel adecuado mínimo de analito (en base al 5% del C_{\max} de Amikacina en plasma humano esperado para la población de estudio), concentración de la cual (2 $\mu\text{g/mL}$), a una dilución de 1:6, se calculó con un valor con el cual la relación entre señal y ruido es de 10:1.

TABLA 30. Límite de detección, n=3.

Relación señal/ruido	CV%	Límite de detección
6.7	12.7	0.16 $\mu\text{g/mL}$

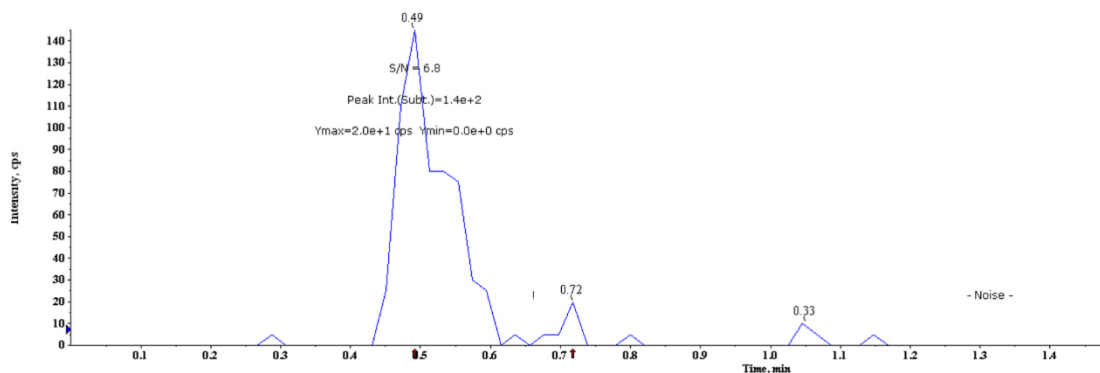


Figura 15. Cromatograma para Amikacina (0.16 $\mu\text{g/mL}$), relación S/R= 6.8.

TABLA 31. Acarreo, n=3.

	Área blanco/ Área LQ (%)	Área blanco/ Área SI (%)
Día 1	0.54	0.15
Día 2	0.90	0.009
Día 3	1.12	0.08
Promedio	0.85	0.08

La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención fueron menores al 20% para el Límite de Cuantificación y del 5% para el

estándar interno, por lo que no hay aparición o aumento de la señal del analito ni estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores a cada inyección en el HPLC-MS/MS, bajo las condiciones del ensayo.

TABLA 32. Linealidad

Muestra	Recuperación (%) Curva 1	Recuperación (%) Curva 2	Recuperación (%) Curva 3	Recuperación (%) Curva 4	Recuperación (%) Curva 5
CC1-1	107	107	114	104	94.7
CC1-2	91.5	93.1	94.6	97.9	
CC1-3	97.7	97.6	92.7	98.7	113
CC1-4	103	102	91.8	103	98.1
CC1-5	102	99.4	97.5	89.5	96.1
CC1-6	101	97.4	103	105	95.7
CC1-7	97.5	103	107	102	103
PC1-1	99.8	109	105	101	90.1
PC1-2	106	107	93.4	86.7	90.5
PC1-3	113	97.3			87.7
PC1-1	108	109	99.2	91.9	93
PC1-2	105	104	100	95.4	89.7
PC1-3	101	99.7	85.5	90.2	108
M	0.677	0.681	0.613	0.593	0.556
R	0.9989	0.999	0.9956	0.9967	0.9968
			$y = 0.677x + 0.0931$		

CC- Curva de Calibración, PC- Punto Control, r- Coeficiente de correlación de Pearson, m-pendiente de la recta.

El modelo cumple con los criterios de un modelo lineal $y=mx + b$ para cada curva de calibración (ver Figura 16), así como las recuperaciones se encuentran dentro del rango nominal por más del 85%, el Coeficiente de correlación mayor a 0.995 en cada una de las curvas evaluadas. Al menos el 75% de las

concentraciones de la curva de calibración se encuentran dentro del 15% de recuperación. Por lo tanto, se demuestra un intervalo lineal de 2-20 µg/mL.

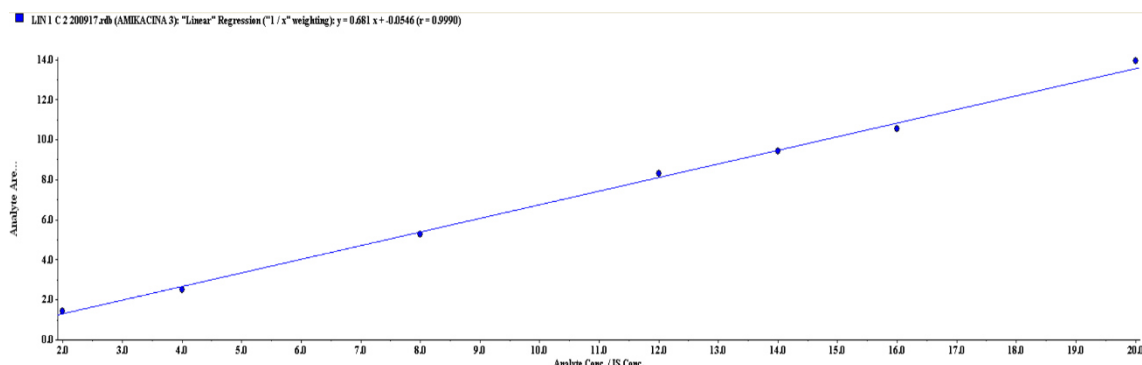


Figura 16. Curva de calibración en plasma humano, a una concentración de Amikacina de 2-20 µg/mL.

TABLA 33. Repetibilidad, n=3.

Día 1	CC1 Conc. µg/mL	CC2 Conc. µg/mL	CC3 Conc. µg/mL	CV%
PC 1	5.9	6.5	6.6	5.3
PC 2	10.5	10.5	10.8	2.7
PC 3	20.4	18.2	17.7	7.8

El CV% del valor promedio para cada punto control en las tres curvas de calibración evaluadas de manera individual en el mismo día, es menor al 10%, por lo que existe concordancia entre los resultados del ensayo.

TABLA 34. Reproducibilidad, n=3.

	Día 1 Conc. µg/mL	Día1 Conc. µg/mL	Día 1 Conc. µg/mL	Día 2 Conc. µg/mL	Día 3 Conc. µg/mL	CV%
PC 1	5.9	6.5	6.6	6.6	5.2	9.7
PC 2	10.5	10.5	10.8	10.5	8.9	7.6
PC 3	20.4	18.2	17.7	18.0	15.5	9.8

Existe concordancia en los resultados de cada punto control de cinco curvas de calibración, evaluadas de manera individual tres en un día y dos en dos días diferentes, en el mismo laboratorio, por el mismo analista. El CV% del valor promedio, es menor al 10%.

TABLA 35. Exactitud

	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	PROM
% Recuperación	102.5	101.9	98.6	97.1	96.6	99.4
% Error	-2.53	-1.9	1.4	2.9	3.4	0.7

El % de recuperación promedio para cada curva de calibración se encuentra arriba del 96, el % de error promedio es menor a 3.4, por lo que se cumple con el criterio de aceptación.

TABLA 36. Estabilidad tiempo cero, n=3.

	Recuperación (%)	CV%
PC 1	93.4	3.7
PC 2	93.9	4.5
PC 3	92.9	2.6

TABLA 37. Estabilidad en automuestreador 2 h, n=3.

	Conc. promedio (µg/mL) tiempo cero	Conc. promedio (µg/mL) 2 h automuestreador	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	6.1	6.61	102.7
PC 2	9.4	10.1	5.57	101.7
PC 3	16.7	17.7	3.78	98.0

TABLA 38. Estabilidad en automuestreador 4 h, n=3.

	Conc. promedio (µg/mL) tiempo cero	Conc. promedio (µg/mL) 4 h automuestreador	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	6.0	4.4	99.3
PC 2	9.4	9.8	3.2	98.1
PC 3	16.7	17.5	3.2	97.3

Tabla 39. Estabilidad en automuestreador 6 h, n=3.

	Conc. promedio (µg/mL) tiempo cero	Conc. Promedio (µg/mL) 6 h automuestreador	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	5.6	0.4	93
PC 2	9.4	9.4	0.1	94
PC 3	16.7	16.6	0.4	92.4

Tabla 40. Estabilidad sobre la mesa, 4 h, temperatura ambiente (25°C), n=3.

	Concentración promedio (µg/mL) tiempo cero	Concentración promedio (µg/mL), temperatura ambiente.	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	6.1	6.6	101.7
PC 2	9.4	8.9	5.6	89.4
PC 3	16.7	18.1	3.8	100.6

Tabla 41. Estabilidad en refrigeración 3 h, 2°C, n=3.

	Concentración promedio (µg/mL) tiempo cero	Concentración promedio (µg/mL) 3 h en refrigeración	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	5.3	3.9	89.7
PC 2	9.4	8.8	4.7	87.8
PC 3	16.7	17.5	3.3	97.0

Tabla 42. Estabilidad en congelación dos semanas, a -70 °C, n=3.

	Concentración obtenida (µg/mL) tiempo cero	Concentración promedio (µg/mL) en congelación dos semanas	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	5.6	6.2	98.3
PC 2	9.4	10.0	0.8	100.3
PC 3	16.7	17.7	1.7	98.3

Tabla 43. Estabilidad en congelación 60 días, a -70 °C, n=3.

	Concentración promedio (µg/mL) tiempo cero	Concentración promedio (µg/mL) en congelación 60 días.	CV%	Recuperación (%)
PC 1	5.6	5.1	6.2	85.5
PC 2	9.4	9.3	0.8	92.9
PC 3	16.7	16.3	1.7	90.7

El desarrollo y validación de un nuevo método de extracción de Amikacina mediante SPE acoplado con HPLC-MS/MS para cuantificación de Amikacina en plasma humano tiene un enorme potencial de aplicación clínica para la optimización del tratamiento. Nuestro método para cuantificación de Amikacina, usando Kanamicina B como estándar interno, nos provee exactitud y precisión en el análisis. El procedimiento de extracción es simple, rápido y selectivo para nuestro analito. Trabajos previos para la cuantificación de aminoglucósidos en plasma humano describen procesos de derivatización (Serrano JM, *et al*¹⁰⁵), lo que aumenta el tiempo de proceso de la muestra, más laborioso e inestabilidad de los derivados para su análisis. Para la validación del método analítico, el rango de concentración de la curva de calibración fue propuesto de acuerdo a la concentración de Amikacina en plasma humano esperado en la práctica clínica. Los ensayos de selectividad, interferencias, efecto matriz, cumplen con los criterios de aceptación ya que el % de recuperación obtenido con respecto al valor real se encuentra dentro del rango 100 – 15%. La evaluación con la adición de fármacos administrados en terapia concomitante con Amikacina y/o sus metabolitos, así como otras sustancias que pueden estar presentes en la matriz biológica, en los ensayos de manera individual, no se demuestra una respuesta analítica significativa próximas al tiempo de retención del analito ni del estándar interno, haciendo de este método adecuado para la población de estudio. No se observó efecto de matriz, prometiendo una cuantificación precisa de Amikacina, debido a la ausencia de picos interferentes. En los ensayos de Precisión el CV% promedio para cada curva de calibración es menor al 15%, haciendo este método preciso y reproducible. La evaluación realizada de

estabilidad del analito en la muestra procesada a la temperatura del automuestreador (8 °C) a tiempos en los cuales se procesa la muestra, así como la estabilidad bajo temperatura ambiente en condiciones de temperatura y tiempo posibles de trabajo, así como las condiciones de almacenamiento y del tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis nos demuestra que el fármaco permanece estable en la matriz biológica ya que la recuperación para cada serie de punto control evaluada se encuentra dentro del 100 -15%.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- 1.- Se establecieron las condiciones espectrométricas y cromatográficas para la determinación de Amikacina y Kanamicina B como estándar interno, por HPLC-MS/MS.
- 2.- Se validó un método analítico mediante HPLC-MS/MS para la cuantificación de Amikacina en plasma humano.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

1. Clinical Pharmacology in Research, Teaching and Health Care-Considerations by IUPHAR, the International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Journal of Basic Clinical Pharmacology and Toxicology 2010; 107: 531-559.
2. World Health Organization. Rational Use of Medicines. http://www.who.int/medicines/area/rational_use/en/index.html. Última revisión 6 de enero del 2018, 22:30 h.
3. González C. Farmacología del Paciente Pediátrico. Revista Médica Clínica Condes 2016; 27(5): 652-659.
4. International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. Definition of TDM & CT. United State. Executive Committee 2013. <https://www.iatdmct.org/about-us/about-association/about-definitions-tdm-ct.html>. Última revisión 12 diciembre del 2017, 21:00 h.
5. Calvo MV, García MJ, Martínez J, Fernández MM. Farmacocinética clínica, Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, Farmacia Hospitalaria, Tomo 1, 2002, cap. 2.12: 625-665.
6. Escobar L. Monitorización Terapéutica de Fármacos y Aspectos Prácticos de Farmacocinética. Revista Médica Clínica Las Condes 2016; 27(5): 605-614.
7. Gamarra-Martínez EF, Serrano-Barrena D, Villamarín Vallejo L. Monitorización Clínica de Medicamentos. Butlletí d'informació terapèutica

del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya 2011; 22(9): 51-56. ISSN 1579-9441.

8. Bertino JS. Therapeutic Drug Monitoring of Antibiotics. The Lancet Infectious Diseases 2014; 14(12), 1180-1181.
9. Jolley ME, Struoupe SP, Wang CH, Panas HN, Keegan CL, Schmidt RL, Schwenzer KS. Fluorescence Polarization Immunoassay I. Monitoring Aminoglycoside Antibiotics in Serum and Plasma. Clinical Chemistry 1981; 27(7): 1190-1197.
10. Álvarez-Lerma F, Olaechea P, Graus S, Marín M, Domínguez A, Martínez-Lanao J, Soy D, Alos M, Calvo M, Sádaba B, Mediavila A, Fatela D. Recomendaciones para la monitorización de antibióticos en pacientes críticos ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2008; 26(4): 230-239.
11. Soto D, Silva C, Andresen M, Soto N, Wong KY. Monitorización terapéutica de antibióticos. Nuevas metodologías: biosensores. Revista Médica de Chile 2015; 143: 1050-1057.
12. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/> . Última revisión 13 de enero del 2017, 20:30 h.
13. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America and the Society for Health care Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. Clinical Infectious Diseases 2007; 44: 159-157.
14. Roberts JA. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. British Journal of Clinical Pharmacology 2011; 73(1): 27-36.
15. McCracken GH, Lietman PS. Assessment of amikacin for pediatric usage. Journal of Pediatrics 1977; 91: 358-360.
16. Rodríguez-Álvarez M. Aminoglucósidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2002; 22(1): 20-30.
17. Sergio-Mella M, Mella MS, Sepúlveda AM, González G, Bello H, Domínguez M, Zemelman Y, Ramírez C. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Revista Chilena de Infectología 2004; 21(4): 330-338.

18. Siddiqi A, Khan DA, Kahn FA, Razzaq A. Therapeutic drug monitoring of amikacin in preterm and term infants. *Singapore Medical Journal* 2009; 50(5): 486-489.
19. Jenkis A, Thomson AH, Brown NM, Semple Y, Sulman, MacGowan A, Lovering AM, Wiffen PJ. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? Asystematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016.
20. Kraus D, Pai M, Rodvold K. Efficacy and Tolerability of Extended Interval Aminoglycoside Administration in Pediatric Patients. *Pediatric Drugs* 2002; 4(7): 469-484.
21. Layeux B, Taccone FS, Fagnoul D, Vincent JL, Jacobs F. Amikacin Monotherapy for Sepsis Caused by Pan resistant *Pseudomona aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54(11): 4939-4941.
22. Cai Y, Yang D, Wang J, Wan R. Amikacin and Cefoperazone/Sulbactam alone or in combination against carbapenem-resistant *Pseudomona aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2018.
23. Shulman S, Yogev R. Treatment of Pediatric Infections with Amikacin as First-Line Aminoglycoside. *American Journal of Medicine* 1985; 79:43-50.
24. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros M, Ammari C, Falagas M. Pharmacological Considerations for the Proper Clinical Use of Aminoglycosides. *Drug* 2011; 71(17): 2277-2294.
25. Bracho-Blanchet E, Porras-Hernández J. Comparación de dos esquemas de antibióticos en infecciones de sitio quirúrgico en niños. *Cirujía y Cirujanos* 2009; 77: 276-285.
26. Amponsah SK, Adjei GO, Enweronu-Laryea C, Bugyei KA, Hadji-Popovski K, Kurtzhals JAL, Kristensen K. Amikacin in Suspected Cases of Neonatal Sepsis in a Low-Resource African Settings: A Prospective Non-Randomized Single-Site Study. *Current Therapeutic Research Clinical and Experimental Journal* 2017; 24: e1-e6.
27. Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003; 21(2): 105-115.
28. Barranco-Hernández E. Aminoglucósidos. *Acta Médica* 1998; 8(1): 48-53.

29. Smyth AR, Bhatt J. Once-daily versus multiple-daily dosing with intravenous aminoglycosides for cystic fibrosis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, Issue 2. Art. No.: CD002009. DOI: 10.1002/14651858.CD002009.pub5.
30. Zhanel GG, Craig WA. Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects, focus on aminoglycosides. *Clinical Pharmacokinetics* 1994; 27(5): 377-392.
31. Daikos GL, Loans VT, Jackson GG. First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991; 35(1): 117-123.
32. Verpooten GA, Giuliano RA, Verbist L. Once daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1989; 45(1): 22-27.
33. Rodieux F, Wilbaux M, Van den Anker J, Pfister M. Effect of Kidney Function on Drug Kinetics and Dosing in Neonates, Infants, and Children. *Clinical Pharmacokinetics* 2015; 54:1183–1204.
34. Saavedra I, Quiñones L, Saavedra M, Sasso J, León J, Roco A. Farmacocinética de Medicamentos de uso pediátrico, visión actual. *Revista Chilena de Pediatría* 2008; 79(3): 249-258.
35. Kraus D, Pai M, Rodvold K. Efficacy and Tolerability of Extended Interval Aminoglycoside Administration in Pediatric Patients. *Pediatric Drugs* 2002; 4(7): 469-484.
36. Morgan-Ortiz F. La significancia clínica de los términos eficacia, efectividad y eficiencia en la investigación clínica. *Revista Médica de la UAS* 2011; 2(1): 3-4.
37. Soriano F. Farmacodinamia: factor predictivo de eficacia. *Anales Españoles de Pediatría* 2002; 56(2): 25-30.
38. Moore R, Lietman P, Smith C. Clinical Response to Aminoglycoside Therapy: Importance of the Ratio of Peak Concentration to Minimal Inhibitory Concentration. *Journal of Infectious Diseases* 1987; 155(1): 93-99.
39. Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick C. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999; 47: 23-30.
40. Michael J. Pharmacodynamics: Relation to antimicrobial resistance. *American Journal of Infectious Control* 2006; 34(5): Supp 1.

41. Morales AI, Arévalo M, Pérez-Barriocanal F. Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad producida por aminoglucósidos. *Nefrología* 2000; XX (5): 408-414.
42. Escalante-Gómez C, Zeledón-Sánchez F, Ulate-Montero G. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. *Acta Médica Costarricense* 2007; 49(2): 83-89.
43. Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, Willnow TE. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 618-622.
44. Hernández-Montero E, Fraile R, Marín C, Sampériz C, Ortiz-García A. Vestibulopatía bilateral por ototoxicidad. *O.R.L. Argón* 2001; 4(1): 20-22.
45. Rubio-Hernández LA, Sedeño C, Fernández A, Arbesú MA, Puig L. Factores de riesgo en el uso de aminoglucósidos en pacientes oncológicos. *Revista Cubana de Farmacología* 2002; 36(2): 93-99.
46. Morales BJ. Drogas Nefrotóxicas. *Revista Médica Clínica Las Condes* 2010; 21(4): 623-628.
47. Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología* 2008; 12(3): 217-226.
48. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanism of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Medical Chemistry Communication* 2015; 7(1): 11-27. DOI: 10.1039/C5MD000344J.
49. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/.2016> . Última revisión 04 de febrero del 2018, 22:00 h.
50. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* 2016; 4(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
51. Ristuccia AM, Cunha BA. An Overview of amikacin. *Therapeutic Drug Monitoring* 1985; 7(1): 12-25.
52. Ramírez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, Resistance and Prospects for Inhibition. *Molecules* 2017; 22(12): 2267.

53. Kurt A. Wargo, Jonathan D. Edwards. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. *Journal of Pharmacy Practice* 2014; 27(6): 573-577.
54. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amikacin#section=Identification>. Última revisión 25 de febrero del 2016, 13:00 h.
55. Drug Bank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00479> . Última revisión 12 de febrero del 2018, 20:06 h.
56. Medscape. Drugs & Diseases. <https://reference.medscape.com/drug/amikin-amikacin-342516#10> . Última revisión 05 de febrero del 2018, 23:00 h.
57. Newborn Drug Protocol. Amikacin Pharmacology. <http://www.adhb.govt.nz/newborn/drugprotocols/AmikacinPharmacology.htm>. Última revisión 29 de enero del 2018, 12 h.
58. Díaz P, González I, Román N, Sudrez M, Tévar E. Manual para la Monitorización de antibióticos. Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Ntra. Señora de Candelaria, 2010.
59. Amikacin Therapeutic Drug Monitoring. The Leeds Teaching Hospital Guidelines 2009. <http://www.pathology.leedsth.nhs.uk/pathology/Departments/Microbiology/OLD/AntibioticMonitoringGuidelines.aspx>. Última revisión 5 de febrero del 2018, 19 h.
60. María-Pacifíci G, Marchini G. Clinical Pharmacokinetics of Amikacin in neonates. *International Journal of Pediatrics* 2017; 5(2): 4407-4428.
61. Amikacin Guidelines. Great Ormond Street Hospital. www.gosh.nhs.uk. Última revisión 5 de febrero del 2018, 22 h.
62. Allegaert K, Coseey V, Van den Anker J. *Current Pharmaceutical Design* 2015; 21(39): 5699-5704.
63. Gahart BL, Nazareno AR, Ortega Q. *Intravenous Medications a Handbook for Nurses and Health Professionals* 2018, 34th Edición, Elsevier. ISBN: 978-0-323-29740-0.
64. Stanford Hospital & Clinics Antimicrobial Dosing Reference Guide 2014, última revisión 30 septiembre del 2017, 17:30 h. <http://portal.stanfordmed.org/depts/pharmacy>
65. Fernandes N, Magacho E, da Silva N, Gomes M. Nomogram for estimation glomerular filtration rate in elderly people, *Brazilian Journal of Nephrology* 2015; 37(3):379-381.

66. Belloli G, Battaglini F, Mercurella A, Musi L, D'Agostino S. Evaluation of upper urinary tract and renal function in patients with posterior urethral valves. *Pediatric Surgery International* 1996; 11(5-6):339-343.
67. Barrantes-González M, Grau S, Conde-Estévez D, Salas E, Marín-Casino M. Influencia de la etnia en el comportamiento farmacocinético de la amikacina. *Revista Española de Quimioterapia* 2013; 26(4): 346-352.
68. Mensa J, Gatell JM, Prats G, Jiménez D. *Guía Terapéutica Antimicrobiana* 2014, Editorial Antares, Barcelona, España. ISBN: 978-84-88825-13-1.
69. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, version 8, 2018, 21:00. <http://www.eucast.org>
70. Leroux S, Zhao W, Bérémiéux P, Pladys P, Saliba E, Jacqz-Aigrain E. Therapeutic guideline for prescribing antibiotics in neonates should be evidence-based: a French national survey. *Archives of Disease in Childhood* 2015; 100: 394-398.
71. Hernández R. Farmacocinética y Farmacodinamia de antibióticos utilizados en pacientes pediátricos con fibrosis quística. *Neumología Pediátrica* 2016; 11(1): 23-27.
72. Gutiérrez-Muñoz VH, Gutiérrez-Muñoz J, Rosas-Barrientos V. Factores de riesgo en sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México. *Revista de Especialidades Médico Quirúrgica* 2005; 10(2): 21-24.
73. Touw D, Westerman E, Sprij A. Therapeutic Drug Monitoring of Aminoglycosides in Neonates. *Clinical Pharmacokinetics* 2009; 48(2): 71-88.
74. Tulkens P, Van Bambeke F. Optimizing Aminoglycoside dosage based on PK/PD. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011.
75. Update on good use of injectable aminoglycosides, gentamycin, tobramycin, netilmicin, amikacin. Pharmacological properties, indications, dosage, and mode of administration, treatment monitoring. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2012; 42(7): 301-308.
76. Contreras A, Cortés J, Santiago Y, Nares F, Jiménez-Sánchez G, Bobadilla J, López G, Valadez A, Espinosa A. Trough and Peak Amikacin Levels in Plasma as Predictors of Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989; 33(6): 973-976.

77. Lugo-Goytia G, Castañeda-Hernández G. Bayesian Approach to Control of Amikacin Serum Concentrations in Critically Ill Patients with Sepsis. *Annals of Pharmacotherapy* 2000; 1389-1394.
78. Peloquin-Charles A, Berning S, Nitta A, Simone P, Goble M, Huitt G, Iseman M, Cook J, Curran-Everett D. Aminoglycoside Toxicity: Daily versus Thrice-Weekly Dosing for Treatment of Mycobacterial Diseases. *Clinical Infectious Diseases Society American* 2004; 38: 1538-1544.
79. Fidel-Rimon O, Friedman S, Leibovitz E, Shinwell E. The use of piperacillin/tazobactam (in association with amikacin) in neonatal sepsis: Efficacy and Safety data. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2006; 38: 36-42.
80. Akondi RB, Chodavarapu RK, Devarakonda KR. Population Pharmacokinetics of Amikacin in Indian Pediatric Patients. *Clinical Research and Regulatory Affairs* 2008; 25(3): 173-182.
81. González M, Grau S, Conde D, Salas E, Marín M. Influencia de la etnia en el comportamiento farmacocinético de la amikacina. *Revista Española de Quimioterapia* 2013; 26(4): 346-352.
82. Duszynska W., Taccone F., Hurkacz M., Kowalska B., Wiela A., Kübler A. Therapeutic drug monitoring of amikacin in septic patients. *BioMed Central, Critical Care* 2013, 17: R165.
83. Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 1, Art. No.: CD003344.
84. Yu T, Stockmann C, Healy DP, Olson J, Weads S, Neely AN, Kagan RJ, Spigarelli MG, Sherwin CM. Determination of Optimal Amikacin Dosing Regimens for Pediatric Patients with Burn Wound Sepsis. *Journal of Burn Care and Research* 2015; 36(4): e244-e252.
85. Allou N, Bouteau A, Augustin P. Impact of a high loading dose of amikacin in patients with severe sepsis or septic shock. *Annals of Intensive Care* 2016; 6: 106.
86. Namazi S, Sagheb MM, Hasempour MM, Sadatsharifi A. Usage Pattern and Serum Level Measurement of Amikacin in the Internal Medicine Ward of the Largest Referral Hospital in the South of Iran: A Pharmacoepidemiologic Study. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2016; 41(3):191-199.

87. Rylander M, Borson JE, Holm S, Norby R. Studies on Some Variables Influencing Aminoglycoside Efficacy *in Vivo* and *in Vitro*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1981; 13(3): 2017-2025.
88. Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. Journal of Chromatography 2004; 1058: 197-201.
89. Baietto L, D'Avolio A, De Rosa FG, Garazzino S, Michelazzo M, Ventimiglia G, Siccardi M, Simiele M, Sciandra M, Di Perri G. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin and rifampicin in human plasma. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010; 396: 791-798.
90. Ezquer C, Escuder L, Martín Y, Ferriols R, Sagrado S, Medina M. Fit-for-purpose chromatographic method for the determination of amikacin in human plasma for the dosage control of patients. Talanta 150 (2016): 510-515.
91. Cristea S, Smits A, Kub A, Kniebbe CAJ, van Weissenbrouch M, Krekels EHJ, Allegaert K. Amikacin pharmacokinetics to optimize dosing in neonates with perinatal asphyxia treated with hypothermia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017, doi:10.1128/AAC.01282-17.
92. Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA1-2013. Pruebas y Procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad.
93. Métodos Estadísticos para la validación de Procedimientos Analíticos-2018-05-01. <https://www.usp.com/es/errata/metodos-estadisticos-para-la-validacion-de-procedimientos-analiticos-2018-05-01>. Última revisión 12 de julio del 2018, 23 h.
94. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 nd ed. (the Gold Book). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997. XML on-line corrected version. <http://goldbook.iupac.org> , created by M. Wic, J. Jirat, B. Kosata, updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.13.51/goldbook>.

95. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry-FDA. <https://www.fda.gov> . Última revisión 28 de julio del 2018, 22 h.
96. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11a. Edición, ISBN: 978-607-460-454-2, vol. II, Apéndice III. Validación de métodos analíticos, p 2795.
97. Kim MY, Liu Y, Sweenson S, Ray G, Dadgar D. Determination of Amikacin in Human Serum Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. KCAS, Shawnee, Kansas.
98. Lu C. Feng Ch. Micro-scale analysis of aminoglycoside antibiotics in human plasma by capillary liquid chromatography and Nano spray tandem mass spectrometry with column switching. Journal of Chromatography A. 2007: 1156, 249-253.
99. Bijleveld Y, de Haan T, Toerche J, Jorjani S, van der Lee J, Groenendaal F, Dijk P, van Heijst A, Gavilanes AW, de Jonge R, Dijkman KP, van Straaten H, Rikjen M, Zonnenberg I, Cools F, Nuytemans D, Mathot R. A simple quantitative method analyzing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to clinical study. Journal of Chromatography B 2014: 110-118.
100. www.phenomenex.com/Impact. Última revisión 2 de abril del 2018, 23:00 h.
101. Majors, R. 2001. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. LCGC North America. 19 (7): 678-687.
102. Young, M., Early, M., Mallet, C., and Krol, J. 2001. Application of a mixed-mode solid phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice. Journal of A.O.A.C International. 84 (5): 1608-1613.
103. Ruiz-Gutiérrez, V., and Pérez-Camino, M. 2000. Review. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. Journal of Chromatography. A. 885: 321-341.
104. Rossi, D., Zhang, N. 2000. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. Journal of Chromatography A. 885: 97-113.

105. Serrano JM, Silva M. Determination of amikacin in body fluid by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. Journal of Chromatography 2006; 843: 20-24.
106. <https://chemicalize.com/calculation> . Última revisión 10 de noviembre del 2018, 23:30 h.

ANEXO A. Preparación de disoluciones estándar, disoluciones de trabajo, reactivos y controles.

- a) Disolución 70/30, v/v, de metanol/agua HPLC, 200 mL.** Se midieron 140 mL de metanol y 60 mL de agua, se transfirieron a un frasco de vidrio de 250 mL, se mezcló en vortex durante 1 minuto.
- b) Disolución 30/70, v/v, de metanol/agua HPLC, 50 mL.** Se midieron 35 mL de agua y 15 mL de metanol, se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 mL, se mezcló en vortex durante 1 minuto.
- c) Disolución de hidróxido de amonio al 5% en agua HPLC, 50 mL, pH 12.** Se transfirió 2.5 mL de hidróxido de amonio a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con agua, se mezcló hasta homogenización. Se midió el pH.
- d) Agua HPLC acidificada, pH 5, 100 mL.** A 100 mL de agua, se añadieron 10 µL de ácido clorhídrico, se llevó a vortex por un minuto. Se midió el pH.
- e) Solución Stock de Amikacina 1 mg/mL.** Se pesaron 10 mg de estándar de Amikacina en un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó a volumen con la mezcla descrita en el punto 4.2.4.1.2, se mezcló en vortex hasta homogenización completa. Se almacenó la solución a 2 °C hasta su utilización.

- f) Solución Stock de Amikacina 2 mg/mL.** Se pesaron 50 mg de estándar de Amikacina en un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó a volumen con la mezcla descrita en el punto 4.2.4.1.2, se mezcló en vortex hasta homogenización completa. Se almacenó la solución a 2 °C hasta su utilización.
- g) Solución Stock de Kanamicina B de 200 µg/mL, como estándar interno.** Se pesaron 10 mg de estándar de Kanamicina B en un matraz volumétrico de 50 mL, se llevó a volumen con la mezcla descrita en el punto 4.2.4.1.3, se mezcló hasta homogenización completa. Se almacenó la solución a 2 °C hasta su utilización.
- h) Preparación de soluciones de Amikacina a una concentración de 1000 ng/mL, en distintas mezclas de solventes.** Se tomó para cada solución 1 mL de solución de trabajo de Amikacina de 10,000 ng/mL en metanol/agua, 70/30, v/v y se llevó a un matraz de aforación de 10 mL, enseguida se añadió 0.5 mL de la solución de trabajo de Kanamicina B de 20,000 ng/mL, se llevó la mezcla a volumen con cada solvente o mezcla de solventes probados como fase móvil.
- i) Preparación de una solución de agua/ACN, 70/30, v/v, al 0.2% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 175 mL de agua, 75 mL de ACN y 1 mL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.

- j) Preparación de una solución de agua/ACN, 30/70, v/v, al 0.2% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 175 mL de ACN, 75 mL de agua y 1 mL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- k) Preparación de una solución de agua/ACN, 98/2, v/v, al 0.05% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 245 mL de agua, 5 mL de ACN y 125 µL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- l) Preparación de una solución de agua/ACN, 2/98, v/v, al 0.05% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 245 mL de ACN, 5 mL de agua y 125 µL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- m) Preparación de Fase Móvil A, agua HPLC al 0.2% de ácido fórmico.**
En un matraz bola de 500 mL se añadieron 450 mL de agua HPLC, se agregó 1 mL de ácido fórmico, se mezcló y se llevó a volumen con agua HPLC.
- n) Preparación de Fase Móvil B, ACN al 0.2% de ácido fórmico.** En un matraz bola de 500 mL se añadieron 450 mL de ACN, se agregó 1 mL de ácido fórmico, se mezcló y se llevó a volumen con ACN.
- o) Preparación de una solución de agua/metanol, 98/2, v/v, al 0.05% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 245 mL de agua, 5 mL de metanol y 125 µL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.

- p) Preparación de una solución de agua/metanol, 2/98, v/v, al 0.05% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 245 mL de metanol, 5 mL de agua y 125 μ L de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- q) Preparación de una solución de agua/metanol, 70/30, v/v, al 0.2% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 175 mL de agua, 75 mL de metanol y 1 mL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- r) Preparación de una solución de agua/metanol, 30/70, v/v, al 0.2% de ácido fórmico (250 mL).** Se mezclaron 175 mL de metanol, 75 mL de agua y 1 mL de ácido fórmico juntos, hasta homogenización completa.
- s) Preparación de una solución de metanol al 0.2% de ácido fórmico.**
En un matraz de aforación de 250 mL se añadieron 150 mL de metanol, se agregó 1 mL de ácido fórmico, se mezcló y se llevó a volumen con metanol.
- t) Preparación de HCl 0.01 N en agua (50mL).** Se añadieron 53.3 μ L de ácido clorhídrico (28-30%) a un matraz de aforación de 50 mL que contenía 30 mL de agua, se mezcló y se llevó a volumen con agua.
- u) Preparación de HCl 0.01 N en metanol (50mL).** Se añadieron 53.3 μ L de ácido clorhídrico (28-30%) a un matraz de aforación de 50 mL que contenía 30 mL de metanol, se mezcló y se llevó a volumen con metanol.

- v) Preparación de HCl 0.1 N en agua (50mL).** Se añadieron 533 μ L de ácido clorhídrico (28-30%) a un matraz de aforación de 50 mL que contenía 30 mL de agua, se mezcló y se llevó a volumen con agua.
- w) Preparación de HCl 0.1 N en metanol (50mL).** Se añadieron 533 μ L de ácido clorhídrico (28-30%) a un matraz de aforación de 50 mL que contenía 30 mL de metanol, se mezcló y se llevó a volumen con metanol.
- x) Preparación de Hidróxido de amonio al 5% en ACN (50mL).** Se mezclaron 2.5 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 47.5 mL de ACN, se mezclaron hasta homogenización completa.
- y) Preparación de Hidróxido de amonio al 5% en Metanol (50mL).** Se mezclaron 2.5 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 47.5 mL de metanol, se mezclaron hasta homogenización completa.
- z) Preparación de Hidróxido de amonio al 5% en agua (100mL).** Se mezclaron 5 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 95 mL de agua, se mezclaron hasta homogenización completa.
- aa) Preparación de Hidróxido de amonio al 10% en agua (50mL).** Se mezclaron 5 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 45 mL de agua, se mezclaron hasta homogenización completa.

bb) Preparación de Hidróxido de amonio al 12% en agua (50mL).

Se mezclaron 6 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 44 mL de agua, se mezclaron hasta homogenización completa.

cc) Preparación de Hidróxido de amonio al 15% en agua (50mL). Se

mezclaron 7.5 mL de Hidróxido de amonio (32-35%) con 42.5 mL de agua, se mezclaron hasta homogenización completa.

ANEXO B. Carta de consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	
Nombre del estudio:	Variables clínicas que afectan la respuesta de los aminoglucósidos a un proceso infeccioso.
Lugar y fecha:	UMAE Hospital de Cardiología No. 34, Departamento de Cardiología.
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Estudiar cómo las variables clínicas se relacionan con la respuesta de los aminoglucósidos a un proceso infeccioso y a la posible aparición de efectos adversos al fármaco.
Procedimientos:	Se hará una revisión de expediente clínico al momento de ingreso del paciente a hospitalización, así como durante y al finalizar su tratamiento con aminoglucósidos, con el fin de identificar las variables clínicas que se relacionen con su respuesta a la terapia antimicrobiana. Se tomará una muestra de sangre por paciente, en un tubo con EDTA, para la cuantificación del fármaco en plasma.
Posibles riesgos y molestias:	Ninguno.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Obtener la concentración eficaz del fármaco relacionada con la mejoría clínica del paciente, evitando y/o disminuyendo la posible aparición de efectos adversos. Optimizar la dosis de aminoglucósidos para los microorganismos sensibles y evitar resistencia bacteriana.
Posibles beneficios que recibirá la sociedad:	Detectar variables clínicas que afecten la respuesta de los aminoglucósidos a un proceso infeccioso, relacionado con la mejoría clínica del paciente.
Posibles beneficios para el avance del conocimiento:	Tiene usted el derecho a recibir respuesta a cualquier duda o pregunta relacionada al trabajo de investigación.
Compromiso de respuesta a preguntas y dudas sobre cualquier asunto relacionado con la investigación:	
Participación o retiro:	Puede retirarse del proyecto en cualquier momento en que lo dese sin ninguna consecuencia.
Privacidad y confidencialidad:	Toda la información recolectada será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.
Beneficios al término del estudio:	Conocer la cantidad de fármaco eficaz, con lo cual se podrá mejorar el tratamiento y/o disminuir la aparición de efectos adversos.
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dr. Arturo Muñoz García
Colaboradores:	Dra. María Elena Molina Garza Q.F.B. Claudia Valeria Cruz Saucedo
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congressos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx	
Nombre y firma del sujeto	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma
Clave:	

ANEXO C. Definición de variables.

Variable	Definición operacional	Unidad de medida	Escala de Medición	Fuente
Edad	Tiempo de vida que tiene el paciente al momento de ingresar a la UCI, según la respuesta de su tutor.	años	Intervalo o cuantitativa	Expediente Clínico
Sexo	Masculino: género gramatical propio del hombre. Femenino: Género gramatical propio de la mujer	Masculino/femenino	Nominal	Expediente Clínico
Peso	Resultado de pesar a los pacientes en una báscula.	kg	Razón o cuantitativa	Expediente Clínico
IMC	En base a lo obtenido de medir con estadímetro y cinta métrica flexible a los pacientes		Intervalo o cuantitativa	
SIRS	Pacientes que presenten dos de los siguientes criterios: -Temperatura corporal $>38.3^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$. -Leucocitosis o leucopenia según la edad del paciente (no secundario a quimioterapia) o bandas $\geq 10\%$. - Frecuencia Cardíaca >2 de lo normal. -Frecuencia respiratoria >2 de lo normal.		Nominal	Expediente clínico
ACLARAMIENTO DE CREATININA	Resultado de la estimación usando la fórmula de Schwartz, que toma en cuenta las variables edad, peso y creatinina plasmática.	mL/min	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
CREATININA SÉRICA	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en suero del paciente al inicio de la terapia.	mg/mL	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
BUN	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en suero del paciente al inicio de la terapia.	mg/dL	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
LACTATO	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en suero del paciente al inicio de la terapia.	mmol/L	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
LEUCOCITOS	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en sangre completa del paciente al inicio de la terapia.	Glóbulos blancos/uL	Razón o cuantitativa	Expediente clínico

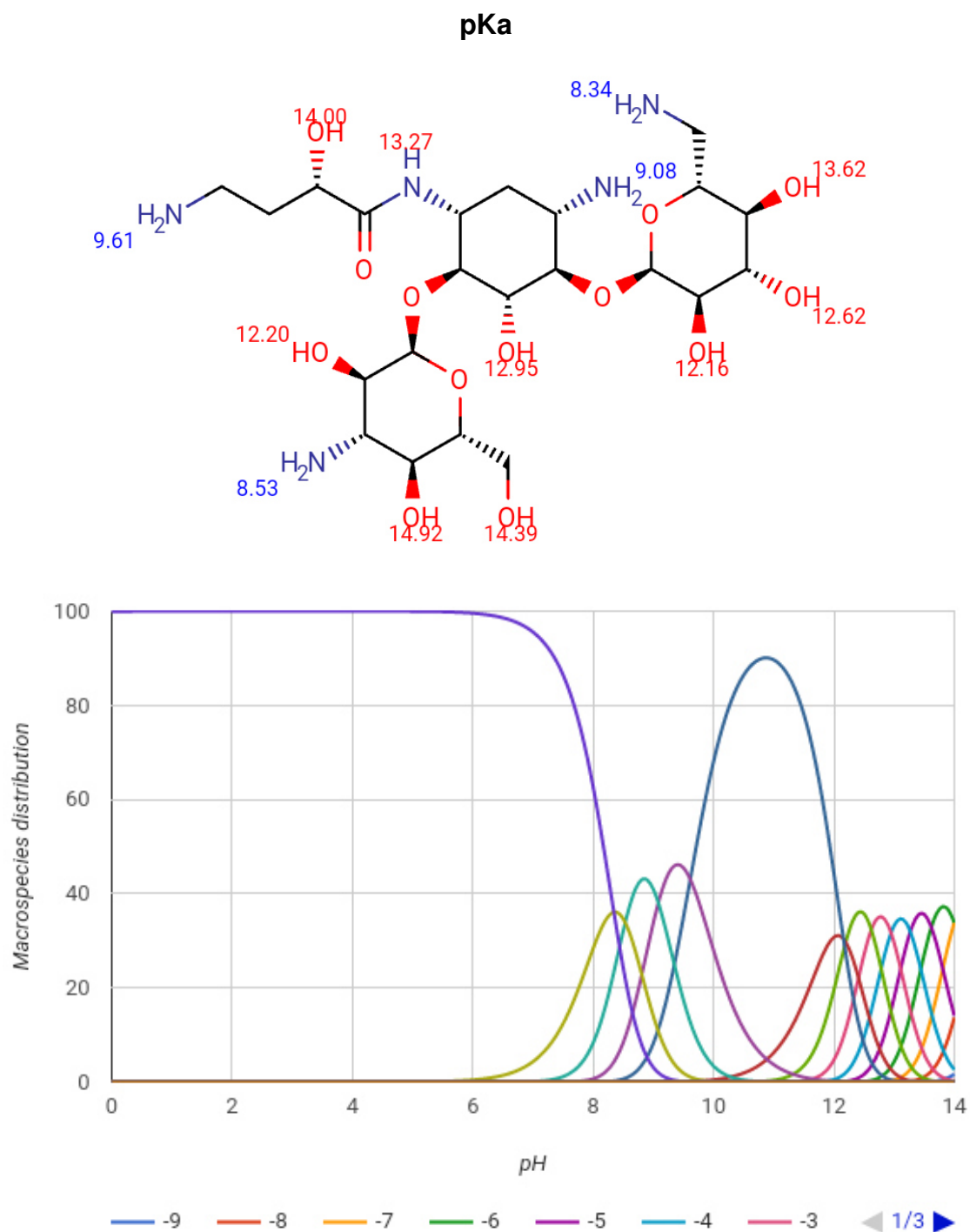
BILIRRUBIN A	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en suero del paciente al inicio de la terapia.	mg/dL	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
HEMATOC RITO	Resultado de la determinación, mediante un analizador automático, en sangre completa del paciente al inicio de la terapia.	%	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
TIEMPO DE PROTROM BINA	Resultado de la medición, mediante un analizador automático en la sangre completa, tomada en un tubo con citrato, al inicio de la terapia.	seg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
ALBÚMINA	Resultado de la cuantificación, mediante un analizador automático, en suero del paciente al inicio de la terapia.	g/dL	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
IBUPROFE NO	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, concomitante con aminoglucósido.	mg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
FUROSEMI DA	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, concomitante con aminoglucósido.	mg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
CEFTAZIDI MA	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, concomitante con aminoglucósido.	mg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
DOPAMINA	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, concomitante con aminoglucósido.	µg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
NORADRE NALINA	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, concomitante con aminoglucósido.	µg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
DOSIS DE AMINOGLU CÓSIDO	Cantidad de fármaco administrado por vía IV, usado como terapia antimicrobiana.	mg	Razón o cuantitativa	Expediente clínico
C _{max}	Resultado de la cuantificación de aminoglucósido en plasma mediante Cromatografía/Espectrometría de Masas	µg/mL	Razón o cuantitativa	

ANEXO D. Instrumento de recolección de datos.

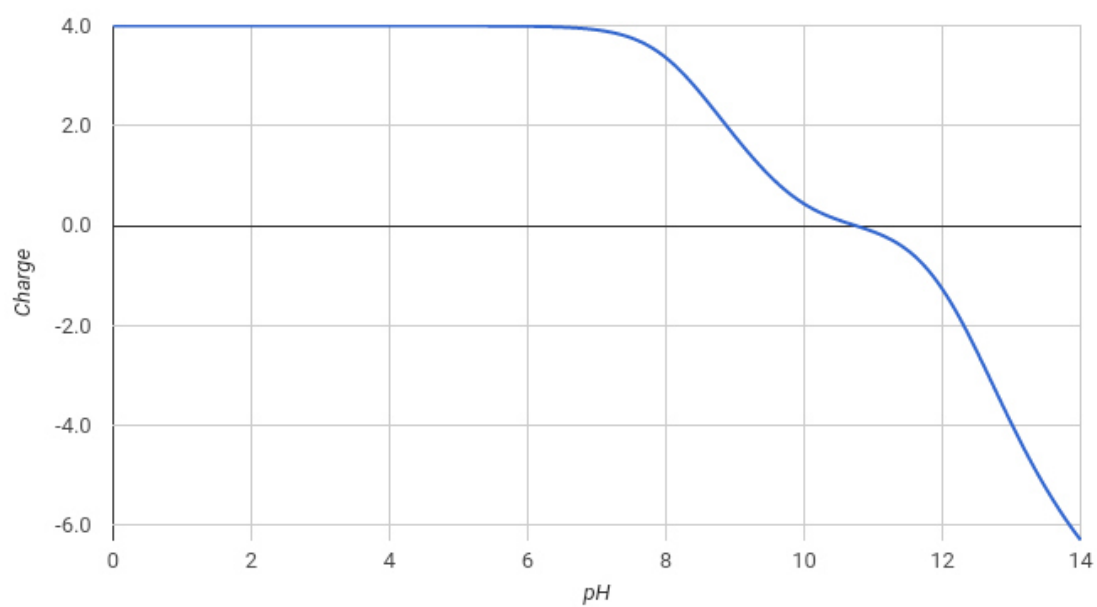
Título de protocolo: Variables clínicas que afectan la respuesta de un aminoglucósido a un proceso infeccioso. No. de registro del protocolo:	Folio:
Datos demográficos	RESPUESTA
Género: 1. Masculino 2. Femenino	
Edad: (años cumplidos al momento de diagnóstico)	
Fecha de ingreso a hospitalización:	
Diagnóstico:	
Fecha donde se establece el diagnostico histopatológico:	
Fecha de la defunción:	
Fecha de mejoría clínica:	
Terapia Farmacológica 1. 2. 3. 4. 5. 6.	Día de inicio
SIRS	
Cultivo	
Peso IMC Temperatura (°C) P.A.	
F. Cardiaca	
Cirugía	
ALBÚMINA	
CATECOLAMINAS	
TERAPIA REPLAZO RENAL	
FILTRACIÓN GLOMERULAR	
CREATININA SÉRICA	
C _{max} aminoglucósido	
LEUCOCITOS	
PROTEINAS	
HEMATOCRITO	
LACTATO	
BUN	
ACLARAMIENTO DE CREATININA	

ANEXO E. Propiedades fisicoquímicas de Amikacina y Kanamicina B¹⁰⁶.

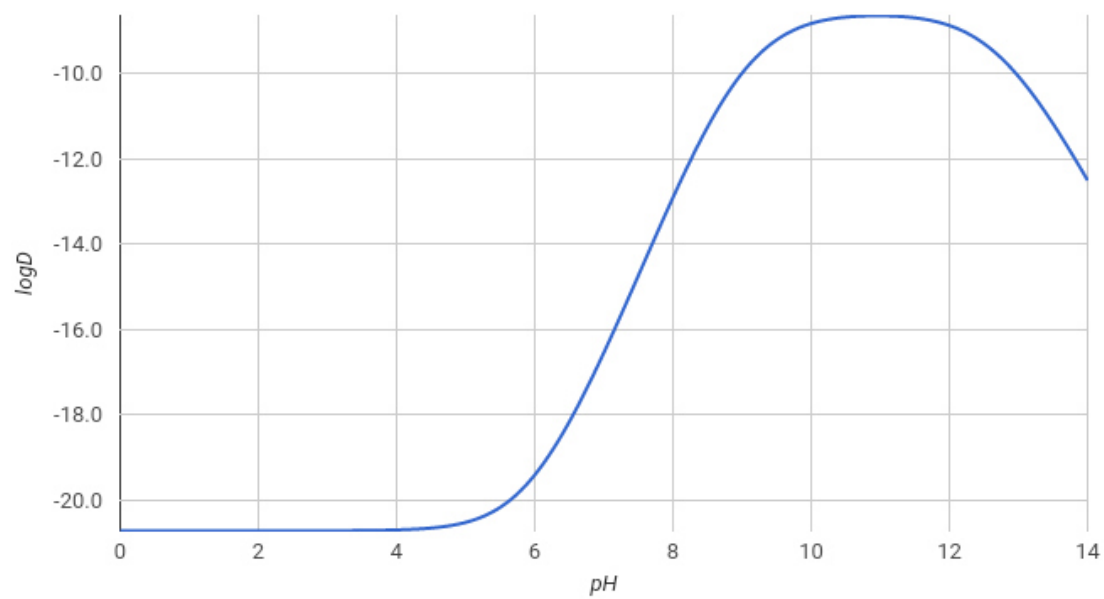
AMIKACINA



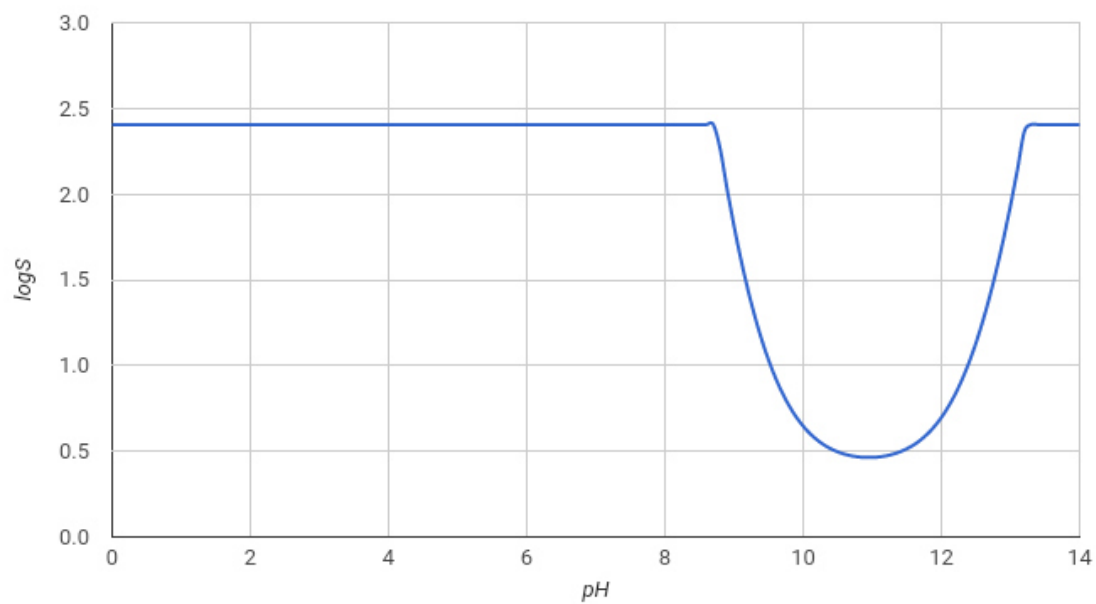
Punto isoelectrico



log D

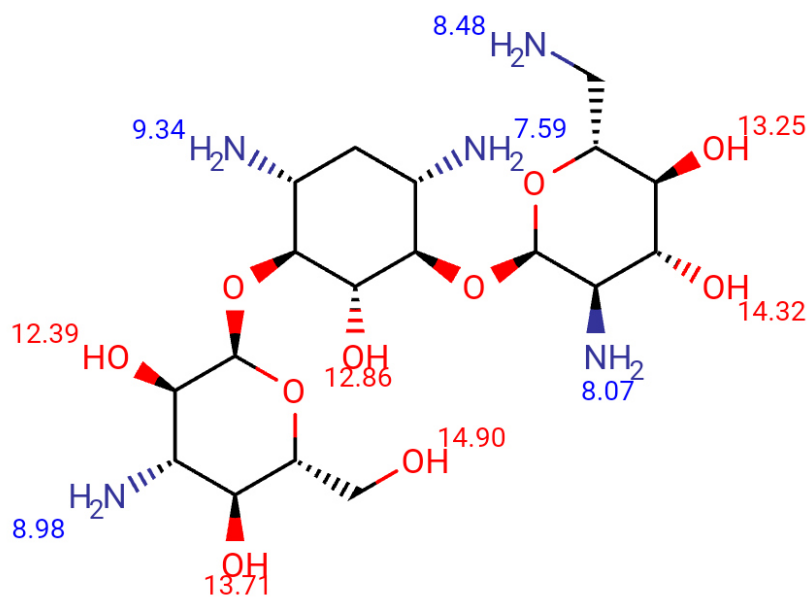


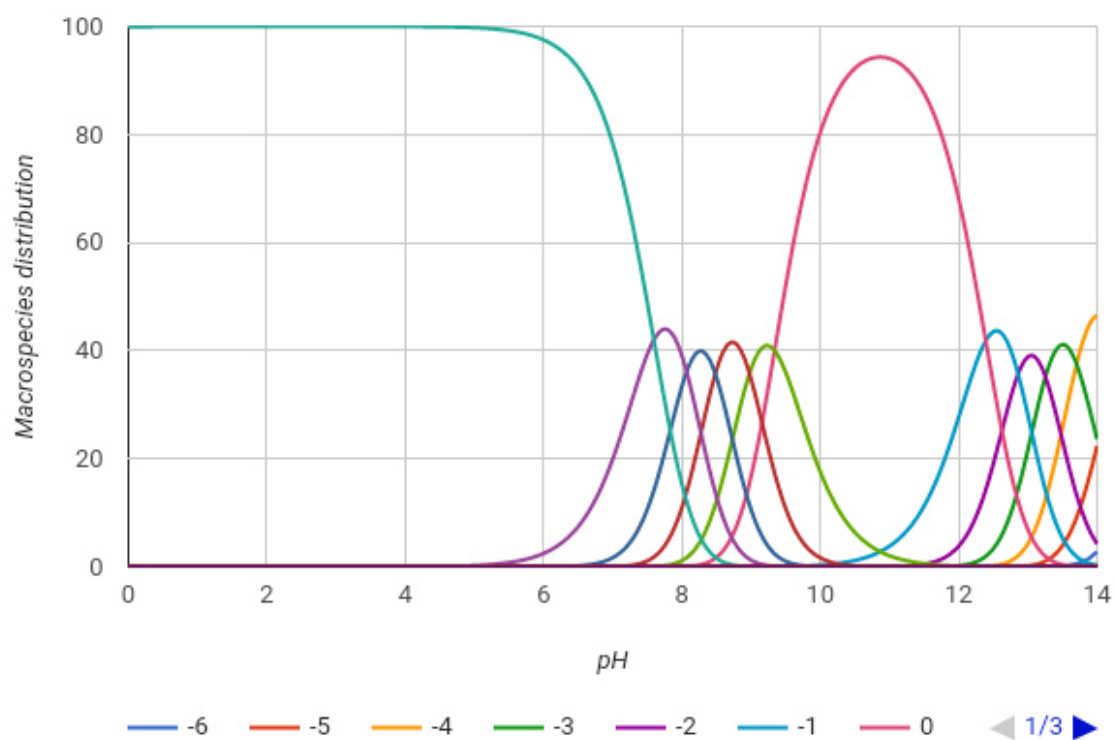
Solubilidad



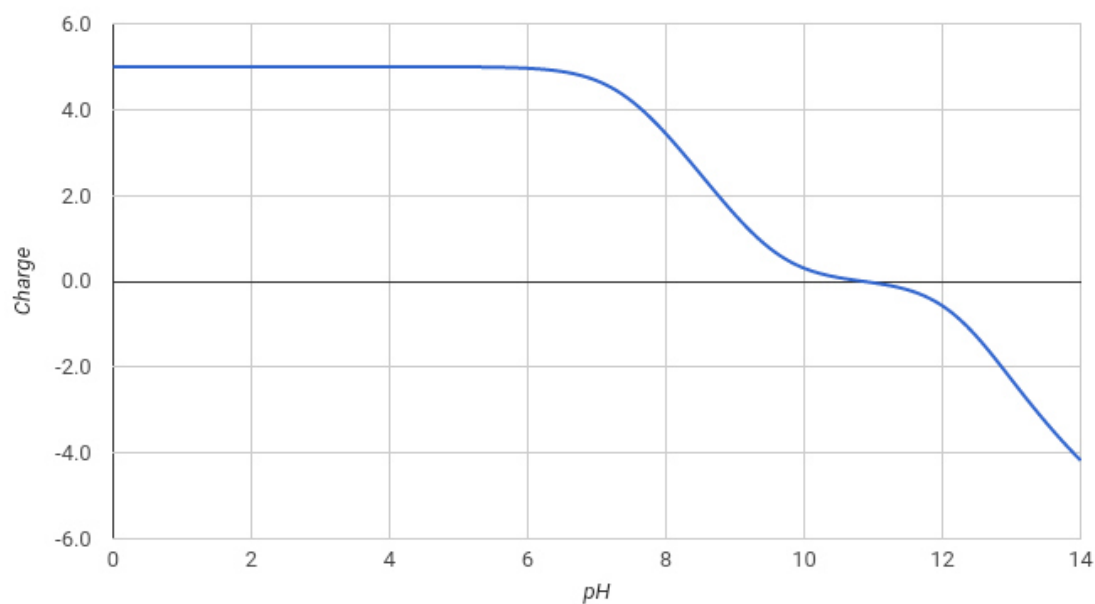
KANAMICINA B

pKa

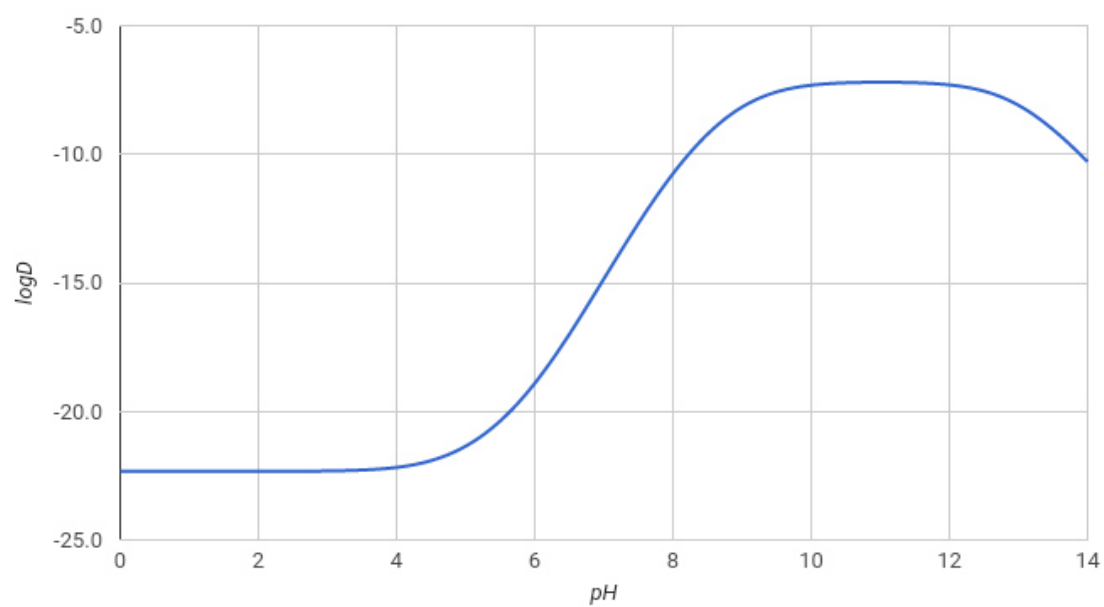




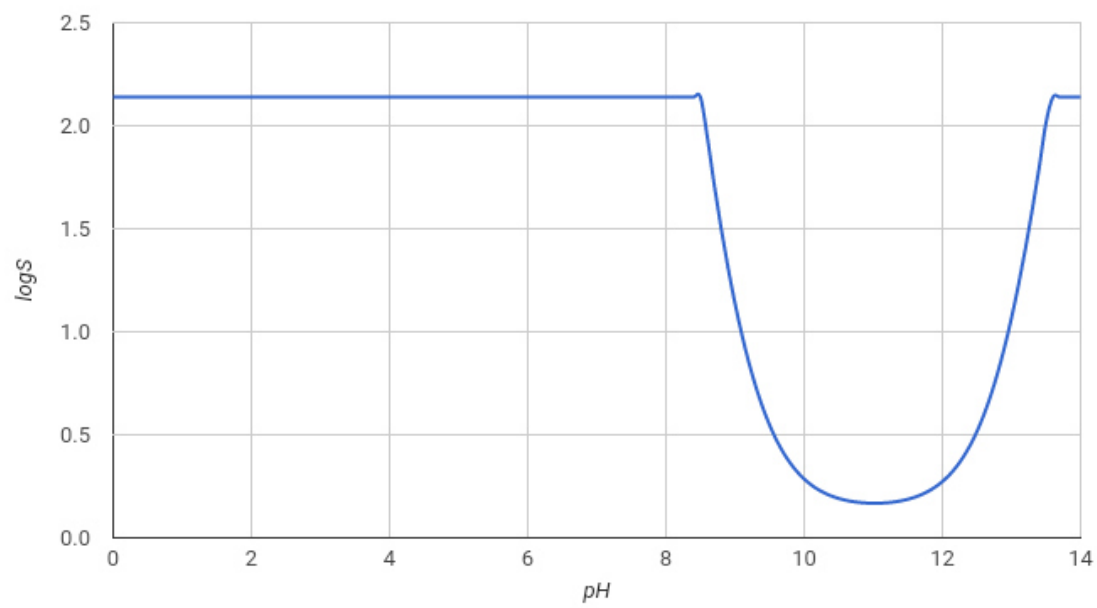
Punto isoelectrico



log D



Solubilidad



RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Claudia Valeria Cruz Saucedo

Candidata para el Grado de
Maestría en Ciencias con Especialidad
En Farmacia

Tesis: EFECTIVIDAD TERAPEUTICA DE AMIKACINA EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON CARDIOPATIAS CONGENITAS O ADQUIRIDAS,
EVALUADA POR PARAMETROS FARMACOCINETICOS.

EDAD: 29 Años

Campo de Estudio: Ciencias Químicas

Biografía:

Datos personales: Nacida el 21 de mayo de 1989, en Ciudad Victoria,
Tamaulipas. Hija de José Cruz Lara y Gloria María Saucedo Mata.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2012,
obteniendo el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Estancia de Investigación en el
The Metabolomics Innovation Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canadá
2016 y 2018.

Experiencia profesional: Practicante de Investigación y Desarrollo Analítico en
Quimiproducos Monterrey, 2011-2012; Químico de Farmacia Hospitalaria en el Centro
Internacional de Medicina, Hospital CIMA, Monterrey, 2012; Químico en Laboratorio
Tamaulipas, 2013; Responsable Sanitario, Jefe de Farmacia en Administradora de
Supermercados Internacionales, H.E.B, 2013–2016.